

國立交通大學

應用化學系

碩士論文

利用螢光偵測技術探討蜂毒胜肽之膜穿孔行為  
Melittin-induced Intermittent Membrane Leakage  
observed with fluorescence techniques

研究生：Yi-Lin Cheng (鄭意玲)

指導教授：Dr. Ian Liau (廖奕翰 博士)

中華民國 九十九 年 九 月

利用螢光偵測技術探討蜂毒勝肽之膜穿孔行為  
Melittin-induced intermittent membrane leakage  
observed with fluorescence techniques

研究生：鄭意玲

Student：Yi-Lin Cheng

指導教授：廖奕翰 博士

Advisor：Dr. Ian Liao

國立交通大學應用化學系

碩士論文

A Thesis

Submitted to Department of Applied Chemistry

National Chiao-Tung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master

in Applied Chemistry

Hsinchu, Taiwan

September 2010

# 利用螢光偵測技術探討蜂毒胜肽之膜穿孔行為

學生：鄭意玲

指導教授：廖奕翰 博士

國立交通大學應用化學系

## 摘要

蜂毒胜肽是蜜蜂 (*Apis mellifera*) 毒液中的主要成分，除了是溶血毒素之外，也有殺菌能力，因此也屬於抗菌胜肽。蜂毒胜肽會使細胞膜變薄，也可在細胞膜上形成孔洞，導致細胞內液外洩，進而殺死細胞。雖然蜂毒胜肽的研究已有多多年，但其在膜上形成孔洞的方式與過程並不完全清楚。為此我們建立了一套共聚焦螢光偵測系統，透過量測螢光分子洩漏進脂質體造成之螢光強度變化，即時觀測胜肽攻擊單一脂質體的過程。我們發現加入蜂毒胜肽之後，脂質體內之螢光訊號出現許多間歇性但強度相近的突峰 (spike)，類似所謂「單分子行為」。經分析突峰上升高度 (rise height)、上升時間 (rise time)、突峰間距 (rise interval) 與峰毒胜肽濃度的關係發現：當蜂毒胜肽濃度升高，突峰之上升高度呈現簡單倍數關係，且峰值間距變小，但是突峰的上升時間不變。從二維的螢光影像中，我們發現脂質體受到蜂毒胜肽攻擊時，螢光上升過程中會脂質體內部螢光皆呈現均勻分布。基於以上初步結果，我們提出三個蜂毒胜肽攻擊細胞膜的可能模型。此外有文獻報導峰毒胜肽可改變細胞膜之流動性，影響膜上維繫細胞存活的生理功能，而導致細胞死亡。我們也利用「螢光相關光譜技術」觀察脂質膜的流動情形。初步結果顯示，蜂毒胜肽吸附於脂質膜後，確會降低脂質膜的流動性；而且當胜肽分子在膜表面的密度達到飽和後，流動性則維持穩定。

# Melittin-induced intermittent membrane leakage observed with fluorescence techniques

Student: Yi-Lin Cheng

Advisor: Dr. Ian Liao

Department of Applied Chemistry

National Chiao-Tung University

## ABSTRACT

Melittin, a small hemolytic peptide, is the major component of the venom of the European honey bee *Apis mellifera*. Melittin possesses also antimicrobial ability and this can also be regarded as an antimicrobial peptide. Earlier work shows that melittin can cause membrane thinning and form pores on membranes; the latter can lead to leakage of intracellular fluid causing cell death. Although there have been extensive studies on the pore forming mechanism of melittin, details of this process remains illusive especially as the concentration of melittin is comparable or below the threshold concentration of pore formation. To address this issue, we have developed a novel mean, based on confocal detection of fluorescence leakage of single vesicles, to investigate interaction between peptides and lipid membranes in real-time. Significantly, we observed occasional occurrence of spikes of comparable intensities, an observation that resembles single-molecules behavior. We carried out single-molecule analysis on rise-height, rise-time, and rise-interval of the time trace of those fluorescence spikes, and the preliminary results show that that the rise-height can be approximated as multiples of a unit number, and the rise-interval decreases as the concentration of melittin increases, while the rise-time remains constant. On the other hand, time-lapse confocal images do not exhibit spatial heterogeneity in the intensity distribution. We proposed three plausible models to account for these observations. We have also carried out fluidity measurements

using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), and found that the treatment of melittin on membranes caused a significant decrease on membrane fluidity, and the change of fluidity exhibits dosage-dependence, but becomes insignificant as the concentration of melittin exceeds some value. The results can be accounted with the formation of domains resulted from electrostatic interaction between adsorbed melittins and lipids.



## 致謝

一晃眼，碩士班兩年的研究生活就此告一個段落了。可以來到這個實驗室，我想我是幸運的！

感謝指導教授廖奕翰博士除了給予研究方面的指導與訓練，也與我分享許多處世之道、待人之理。並且，感謝廖老師在我寫論文過程中，給予的協助與建議，讓我的論文更加完整與豐富。

此外，感謝許多人這一路的陪伴。感謝美方學姐與慧貞學姐為我解決與研究主題相關的疑惑。感謝小蔥學姐除了給予儀器方面的協助，在剛進入實驗室也給我很多建議，讓我可以很快適應實驗室生活。與我同梯次進來的士豪與嘉仁，兩年來我們也在打打鬧鬧的方式中培養出革命情感，一起讀書、一起熬夜做實驗、一起打球，使我不覺得孤單。逸群學長的幽默風趣、大衛的談笑風生與學翰的妙語如珠，總讓實驗室笑聲不斷。對於相處的時光不多的秀蘭學姐、小龜學長、Bush 學長、與鍾昭宇學長，謝謝你們寶貴的經驗分享。還有碩一的凱禾、紹剛、焯彥、阿涼，與專題生 Eric、大胖、老人、依霖、土豆、小傑、嘟嘟、沂哥、毓翔、宏德與紹群，你們的青春活力為實驗室帶來滿室朝氣，看到你們投注在研究上的勤奮與努力，也我似乎也受到鼓舞。另外，還要感謝依純、阿烈、子禎與卡爾學長給我的鼓勵與支持。

還要感謝從大學時就陪伴我的正妹室友們：佳伶、立棋、佳蓉，小栗，每當我們彼此分享實驗室的點點滴滴後互相打氣，再辛苦的事也會昇華成一道動力。最後要感謝我的家人，做我強力的後盾，使我在研究之路上無後顧之憂。

謝謝所有幫助過我的人，我真的很幸運可以遇到你們！

# 目錄

	頁次
摘要.....	i
ABSTRACT.....	ii
致謝.....	iv
目錄.....	v
圖目錄.....	vi
表目錄.....	vii
第一章、背景介紹.....	1
1-1 蜂毒胜肽基本性質與抗菌胜肽攻擊細胞膜之模型介紹.....	1
1-2 蜂毒胜肽與細胞膜作用之相關文獻.....	6
1-3 研究動機與目標.....	9
第二章、研究方法.....	13
2-1 測量系統.....	13
2-1-1 共聚焦單點螢光系統.....	13
2-1-2 共聚焦螢光影像系統.....	17
2-1-3 螢光相關光譜系統.....	18
2-2 樣品製備.....	23
2-3 混合脂質體與不同濃度蜂毒胜肽的樣品製備與量測.....	26
2-3-1 共聚焦單點螢光系統與共聚焦螢光影像系統.....	26
2-3-2 螢光相關光譜系統.....	27
第三章、結果與討論.....	28
3-1 脂質體與蜂毒胜肽作用後亮視野影像變化.....	28
3-2 脂質體與蜂毒胜肽作用後內部共聚焦螢光隨時間的變化.....	31
3-3 利用共聚焦顯微鏡觀察脂質體與蜂毒胜肽作用後的螢光影像變化.....	43
3-4 脂質體與蜂毒胜肽作用後膜流動性的變化.....	52
第四章、結論與未來展望.....	56
附錄.....	57
附錄一 實驗相關藥品.....	57
參考資料.....	58

# 圖目錄

圖 1-1 抗菌胜肽的兩種破壞細胞膜的機制 .....	4
圖 1-2 蜂毒胜肽的立體結構 .....	5
圖 1-3 細胞膜通透性實驗設計 .....	11
圖 2-1 自行組裝的共聚焦螢光顯微鏡系統架設圖 .....	15
圖 2-2 共聚焦螢光顯微鏡系統中雷射、各濾片、與染料之特性光譜 .....	16
圖 2-3 自行組裝的螢光相關光譜系統架設圖 .....	20
圖 2-4 螢光相關光譜系統之雷射光源、各濾片與染料之特性光譜 .....	21
圖 2-5 Alexa633 的自相關函數與擬合結果 .....	22
圖 2-6 脂質體製備流程 .....	25
圖 3-1 脂質體與蜂毒胜肽作用後亮視野影像變化 .....	30
圖 3-2 不同蜂毒胜肽濃度下的單點共聚焦螢光強度隨時間變化圖 .....	34
圖 3-3 突峰參數定義與統計分析示意圖 .....	35
圖 3-4 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升高度 (rise height) 統計圖 .....	36
圖 3-5 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升時間 (rise time) 統計圖 .....	37
圖 3-6 不同蜂毒胜肽濃度的突峰峰值間距 (rise interval) 統計圖 .....	38
圖 3-7 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升高度之高斯多峰分布擬合結果 .....	39
圖 3-8 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升時間之高斯多峰分布擬合結果 .....	40
圖 3-9 不同蜂毒胜肽濃度的突峰峰值間距之高斯多峰分布擬合結果 .....	41
圖 3-10 未加蜂毒胜肽的脂質體之共聚焦顯微鏡影像與分析 .....	46
圖 3-11 加入 2 $\mu$ M 蜂毒胜肽的脂質體之共聚焦顯微鏡影像與分析 .....	47
圖 3-12 加入 2 $\mu$ M 蜂毒胜肽的脂質體之共聚焦顯微鏡影像與分析 .....	48
圖 3-13 單一蜂毒胜肽攻擊造成間歇性強度增加模型 .....	49
圖 3-14 單一蜂毒胜肽攻擊造成持續性強度增加模型 .....	50
圖 3-15 多重蜂毒胜肽攻擊造成間歇性強度增加模型 .....	51
圖 3-16 混合不同蜂毒胜肽濃度後的染料分子 DiD 在 POPC 膜上運動得到的自相關曲線圖 .....	53
圖 3-17 不同蜂毒胜肽濃度的流動性統計結果 .....	54

## 表目錄

表 3-1 不同蜂毒胜肽濃度的上升高度多峰擬合結果 .....	42
表 3-2 不同蜂毒胜肽濃度的上升時間多峰擬合結果 .....	42
表 3-3 不同蜂毒胜肽濃度的峰值間距多峰擬合結果 .....	42
表 3-4 不同蜂毒胜肽濃度的流動性統計結果 .....	55



# 第一章、背景介紹

## 1-1 蜂毒胜肽基本性質與抗菌胜肽攻擊細胞膜之模型介紹

當生物受到外物入侵時，會啟動自己的防禦措施。鳥類、爬蟲類等脊椎動物有先天免疫系統與後天免疫系統把關。植物除了有細胞壁的屏障之外，還會分泌酵素抑制外物入侵，例如可分解真菌細胞壁的葡聚糖酶 (glucanase)<sup>1</sup> 與幾丁質酶 (chitinase)<sup>2</sup>。魚類部份臟器上的肥大細胞 (mast cell)<sup>3,4</sup> 內存在具有溶血作用的胜肽，魚體表面受傷時，細胞組織蛋白會斷裂釋出胜肽片段來抵禦入侵的微生物<sup>5</sup>。而許多昆蟲會在體內形成小分子的胜肽來破壞入侵物的細胞膜<sup>6</sup>。這類小分子胜肽最早是在 1960 年代被發現，科學家無意間從實驗中發現動植物被細菌入侵時，會分泌小蛋白質攻擊細菌，使其迅速死亡，因此便將此類蛋白質命名為抗菌胜肽 (antimicrobial peptide, AMP)。

值得一提的是，這些抗菌蛋白雖小，它對生物體的保護作用卻非常大。一般來說，我們利用抗生素來消滅體內的微生物，服用後需要一段反應時間才可將細菌殺死，而且長期服用容易出現抗藥性。抗菌蛋白依照消滅細胞的方式主要可以分為，細胞內部殺害 (intracellular killing) 與形成穿膜孔洞 (transmembrane pore-forming) 兩大類<sup>7</sup>。前者可能會讓細胞內物質凝聚<sup>8</sup>、抑制細胞膜合成<sup>9</sup>、抑制核酸合成<sup>10</sup>、抑制蛋白質合成<sup>11</sup>、或是以抑制酵素作用<sup>12</sup>的方式使細胞失去功用而死亡；後者會在細胞膜上形成孔洞或讓細胞膜碎裂導致細胞死亡。針對形成孔洞的抗菌蛋白而言，破壞入侵物的方法，是利用胜肽與微生物細胞膜上相異的電性而吸附在膜上，接著會在膜上形成聚集，進而使細胞膜產生孔洞或破裂，最後細胞質外漏導致細菌死亡。抗菌蛋白產生與作用的速度很快，可在幾分鐘之內殺死細菌。此外，因為抗菌蛋白是物理性的破壞，較不易產生抗藥性，可以廣泛

作用在病毒、細菌、與真菌上<sup>7</sup>。一般而言，抗菌蛋白有幾個特性：胺基酸序列不超過 60 的小分子、帶正電、同時擁有親水端與疏水端的性質。有許多因素會影響肽的抗菌力：肽的二極結構 (conformation)、肽的電荷 (charge)、疏水性強弱 (hydrophobicity)、極性角度 (polar angle)<sup>13</sup>。

抗菌蛋白主要有兩種破壞細胞膜的機制：桶板模型 (barrel-stave model) 與地毯模型 (carpet model)<sup>14</sup>，有的科學家提出第三種機制環孔模型 (toroidal pore model)，但此種模型可併入地毯模型內。(圖 1-1)

在水溶液中，抗菌蛋白單體會在隨機纏繞 (random coil) 與螺旋狀 ( $\alpha$ -helix) 兩種結構中做轉換，並以  $\alpha$ -helix 的結構靜電吸附到細胞膜上。在桶板模型中，覆蓋在膜上的抗菌蛋白會穿透脂雙層 (lipid bilayer) 聚集成束，形成疏水面朝向脂質核心 (lipid core)、親水面朝向內部的穿膜孔洞 (transmembrane pore)。在進行地毯模型的過程中，抗菌蛋白從頭到尾與脂質頭端 (lipid headgroups) 相接，當吸附在膜上的抗菌蛋白數量超過一個門檻 (threshold) 時，抗菌蛋白會旋轉 (rotation) 形成穿膜孔洞，也就是環孔。此模型與桶板模型的不同點在脂質分子的排列方式，地毯模式的抗菌蛋白分子即使垂直穿透細胞膜平面，其周圍的脂單層 (lipid monolayer) 會彎曲並以頭端與抗菌蛋白相接，形成如微胞 (micelle) 的排列；穿透膜的抗菌蛋白分子會進一步吸附在脂質內層 (lipid inner leaflet)，或是小區塊的脂質被抗菌肽包圍而脫離，形成小碎片。在所有的抗菌肽中，屬於 barrel-stave model 攻擊模式的有 alamethicin；屬於 carpet model 攻擊模式的有 Dermaseptin S、cecropin、ovispirin<sup>7</sup>。

在自然界中，有一類毒素，因其作用機制與抗菌肽很類似，也會對細胞膜造成破壞，近年來被歸類為抗菌肽中。蜂毒肽即為一例。

當我們遭受蜜蜂叮咬時，其毒液內含有一種小分子肽--蜂毒肽，與紅血球接觸會引起溶血作用。而科學家對於它究竟如何對細胞膜進行破壞，一直都很好奇，也不停的在尋求解答中。從純化與定序出來<sup>14</sup>，已有許多科學家投入它的相關研究<sup>15, 16, 17</sup>。

本實驗要研究的蜂毒胜肽 (melittin)，取自歐洲蜜蜂 *Apis mellifera* 的毒液，為蜂毒內的主要成分之一，佔了毒液除水後百分之五十的重量<sup>15</sup>，屬於溶血性胜肽，後來科學家發現它也具有殺菌能力<sup>6</sup>。蜂毒胜肽由 26 個胺基酸組成，其序列為 NH<sub>2</sub>-GIGAV-LKVLT-TGLPA-LISWI-KRKRQ-Q-CONH<sub>2</sub><sup>14</sup>，前 20 個胺基酸的序列為疏水端 (hydrophobic tail)，最後 6 個胺基酸為親水端 (hydrophilic tail)。這兩種同時存在的性質使得蜂毒胜肽可以自然的與細胞膜接觸與反應。在與人體液相同的生理環境下，蜂毒胜肽會帶 5-6 個正電 (序列中畫底線者)，主要分布在親水端，此電荷分布與蜂毒胜肽的作用機制有很大的關係。(圖 1-2) 在低濃度或低鹽度水溶液中，蜂毒胜肽是呈現隨機纏繞 (random coil) 結構的單體 (monomer)，當蜂毒胜肽吸附到細胞膜上，則會轉變成彎曲的螺旋狀 (bent  $\alpha$ -helix)，並以此形式進行穿膜行為；若是在強鹼、高濃度或是高鹽度的環境下，蜂毒胜肽會形成四聚體 (tetramers)<sup>18</sup>。

目前的研究結果顯示蜂毒胜肽是以 barrel-stave model 進行膜穿孔。當隨機纏繞的蜂毒胜肽因靜電作用吸附在細胞膜上，會轉變成 bent  $\alpha$ -helix 結構。在低濃度的情況下，蜂毒胜肽會以螺旋軸 (helix axis) 平行細胞膜平面的方式存在膜上。隨著蜂毒胜肽的濃度變高而出現穿透膜 (transmembrane) 的行為，螺旋軸垂直細胞膜平面的胜肽比例也會漸漸提升，多個蜂毒胜肽聚集後形成孔洞。

因為蜂毒胜肽有分子小、易取得、反應快速的優點，除了其本身的作用機制被廣泛研究外，也有與其他抗菌胜肽複合物的延伸研究出現，近年來，更常被當作探討脂質-蛋白質交互作用 (lipid-protein interaction) 的模型。而蜂毒胜肽的溶血性與抗菌機制，不只作用在細菌與真菌身上，對癌細胞也有破壞的效果<sup>19</sup>，加上無抗藥性的特質，以蜂毒胜肽為基底的抗癌藥物開發可謂潛力無窮。

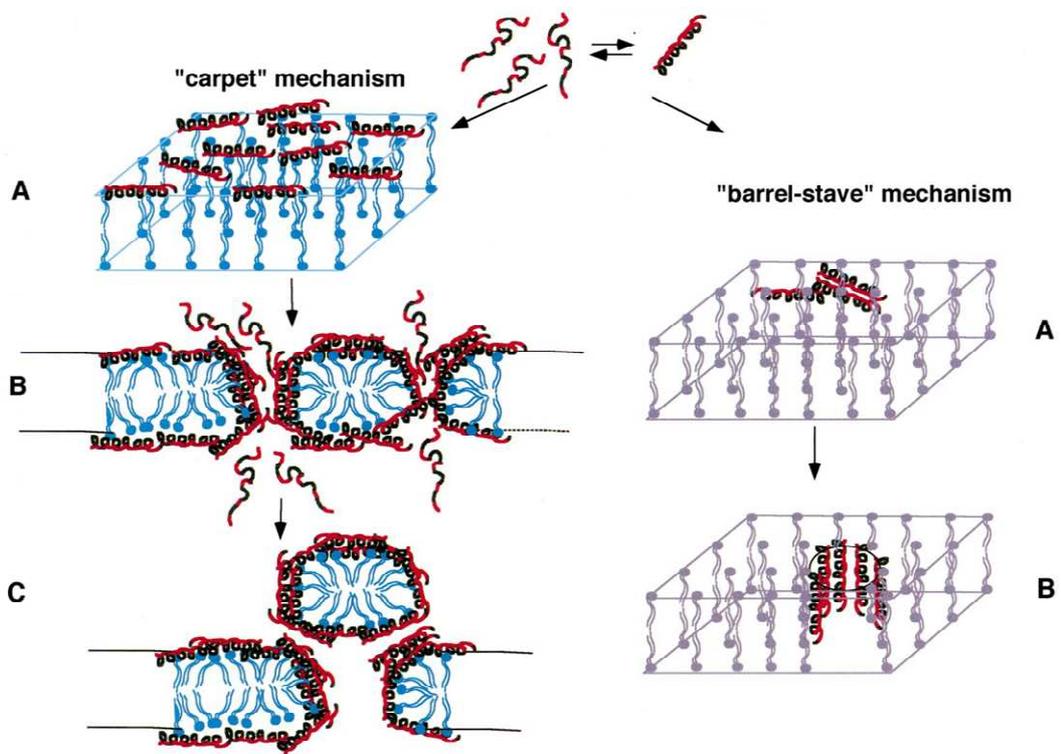


圖 1-1 抗菌胜肽的兩種破壞細胞膜的機制<sup>14</sup>。

地毯模型 (carpet model) 與桶板模型 (barrel-stave model)。在地毯模型中，胜肽分子利用具疏水性的一側與細胞膜相接 (圖中黑色區域)，親水側則面向水溶液 (紅色區域)。當胜肽濃度到達某個門檻 (threshold) 時，細胞膜會被破壞形成小碎片。桶板模型中，覆蓋在膜上的胜肽會穿透脂雙層聚集成束，形成疏水面朝向脂質核心 (lipid core)、親水面朝向內部的穿膜孔洞 (transmembrane pore)。

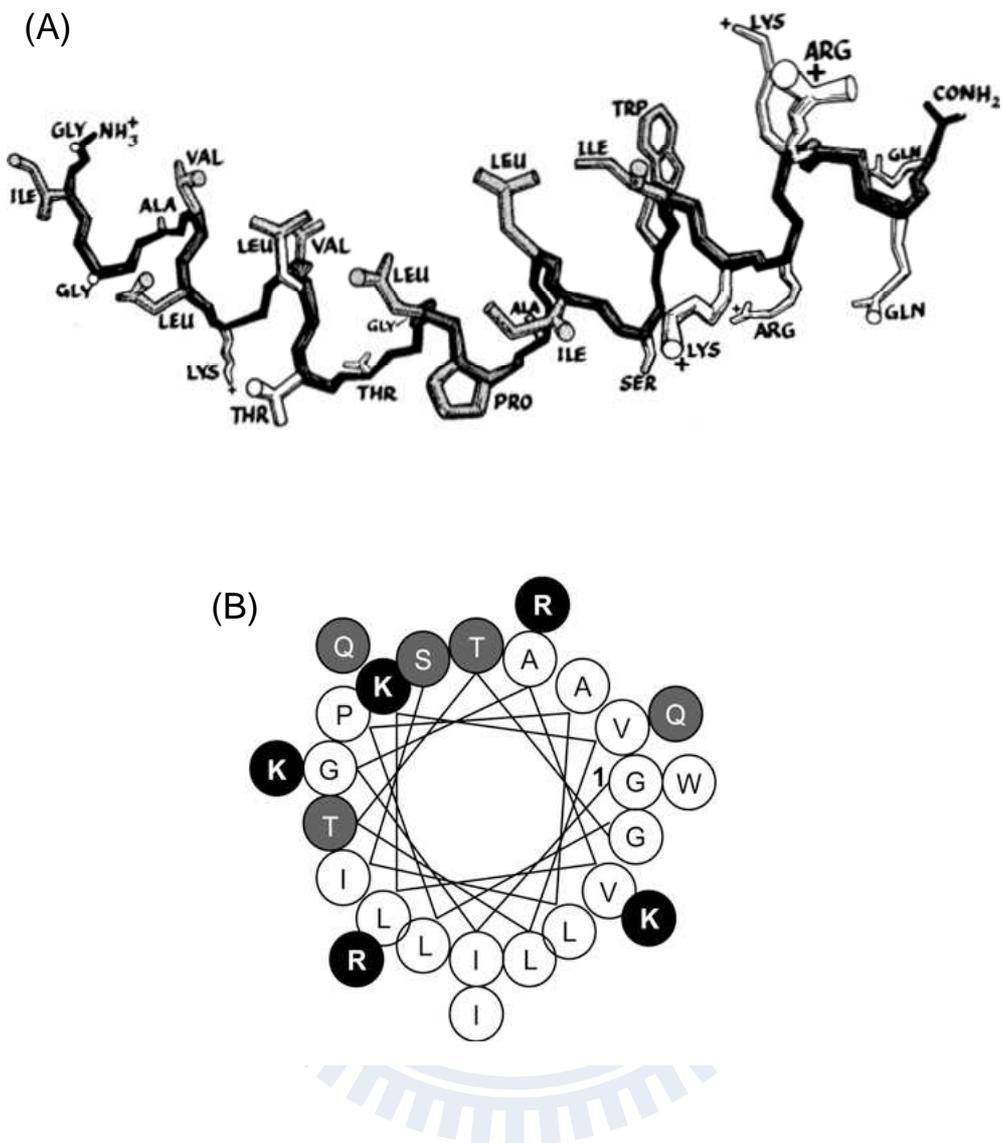


圖 1-2 蜂毒胜肽的立體結構。

(A) Bent  $\alpha$ -helix<sup>20</sup>。(B) Helical wheel projection<sup>22</sup>。蜂毒胜肽有 26 個胺基酸，其序列為  $\text{NH}_2\text{-GIGAV-LKVL T-TGLPA-LISWI-KRKRQ-Q-CONH}_2$ ，前 20 個胺基酸的序列為疏水端（圖中白色的區域），最後 6 個胺基酸為親水端（圖中灰黑色區域），這兩種同時存在的性質使得蜂毒胜肽可以自然的與細胞膜接觸與反應。在正常生理環境下，蜂毒胜肽會帶 5-6 個正電。

## 1-2 蜂毒胜肽與細胞膜作用之相關文獻

在本章節，將要回顧蜂毒胜肽與細胞膜作用的相關文獻，了解這個領域內其他團隊使用的不同細胞膜模型、測量方法與發現到的結果。

蜂毒胜肽首先於 1967 年由 Habermann 與 Jentsch 解出 26 個胺基酸序列<sup>14</sup>，接著在 1969 年 Jentsch 利用旋光色散法 (optical rotatory dispersion) 測量出蜂毒胜肽的多肽鏈在水中呈現隨機構形<sup>21</sup>。

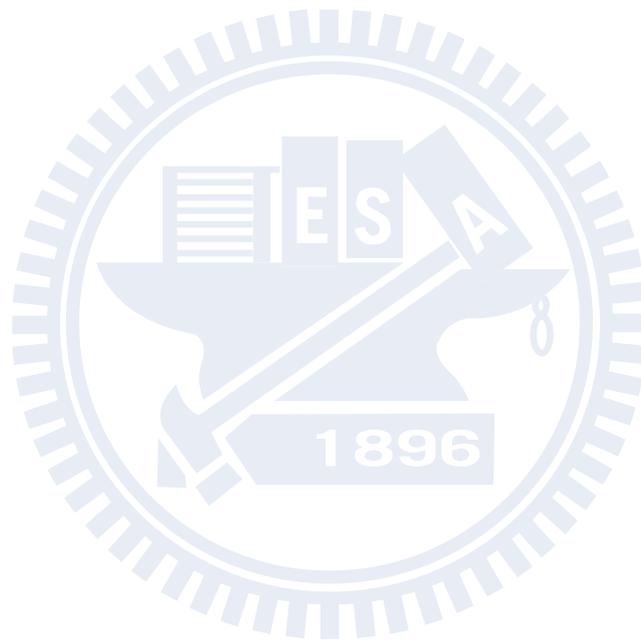
1971 年 Kreil 等人首次在活體內將蜂毒胜肽上，其中一種胺基酸的碳置換成具有輻射線的同位素，並發現存在一個蜂毒胜肽的前趨物「promelittin」<sup>22</sup>。1981 年 Steiner 等人在免疫學期刊上發表，蜂毒胜肽不只會溶解紅血球細胞，也會對 *E.coli* 產生殺菌的作用<sup>6</sup>。

2000 年 Lin 等人利用分子模擬單一蜂毒胜肽吸附在細胞膜上的情形，除了發現蜂毒胜肽與細胞膜間保持一定距離，也發現此胜肽有髮夾狀 (hairpin-like) 的結構，且夾頂在 proline 上<sup>23</sup>。同年，Natio 等人利用 NMR 觀察到胜肽分子在膜上會以平均螺旋軸轉動或是結構重組，而且他們也發現蜂毒胜肽的彎曲角度為 140° 或 160°，當胜肽持續進行穿膜與形成孔洞的動作時，脂雙層會被推開，進而導致膜的碎裂。2001 年 Yang 等人利用中子繞射 (neutron diffraction) 與指向性雙圓極化光吸收光譜技術 (oriented circular dichroism) 求得，蜂毒胜肽在 POPC 脂質膜上形成的孔洞外徑與內徑分別為 7.6 nm 與 4.4 nm，且孔洞大小與胜肽的濃度無關，且從孔徑的大小判斷，較有可能屬於 toroidal model，而蜂毒胜肽的 helical axis 垂直於膜的量會與胜肽濃度有關<sup>24</sup>。同時，2003 年 Papo 等人利用表面電漿共振技術 (surface plasmon resonance) 觀測蜂毒胜肽嵌入不同電性的脂質過程的結合與解離常數，並用兩種模型模擬穿膜行為<sup>25</sup>。

2004 年 Huang 等人想探討孔洞形成的動力與膜變薄的關連性，並提出孔洞上存在兩種張力互相抗衡的假設：膜表面張力促使孔洞開啟，而孔緣的線性張

力導致孔洞關閉。另外，他們同時發現蜂毒胜肽與脂質分子到達一定比例後，細胞膜厚度會趨於一穩定值<sup>26</sup>。同一個團隊於 2008 年在 PNAS 期刊中，利用微管吸引法 (micropipette aspiration method)<sup>27</sup> 固定單一脂質體，並配合相差影像技術，發現蜂毒胜肽存在一個閾值，在此閾值兩方的反應不相同：濃度低於  $10^{-7}$   $\mu\text{M}$ ，細胞膜到蜂毒胜肽攻擊時，脂質體的體積維持不變，且膜表面積會有一定比例的延展現象；濃度高於  $10^{-7}$   $\mu\text{M}$ ，脂質體除了出現表面積有更高比例的延展並維持外，還會出現膜延展後快速恢復為原大小的現象<sup>29</sup>。同一年，由 Bogaart 帶領的另一個團隊利用測試不同批次的小顆單層脂質體，與溶液中蜂毒胜肽作用後的螢光洩漏情形，提出蜂毒胜肽在細胞膜上吸附-穿膜的競爭模型，他們認為，因蜂毒胜肽之間的排斥力，細胞膜可吸附的胜肽有一定的量，且經計算後可知胜肽之間的平均距離為 2.5 nm，而吸附在膜上的胜肽影響穿膜行為<sup>28</sup>。這個團隊稍早也測試蜂毒胜肽在不同脂質分子上的行為，他們發現，蜂毒胜肽會對中性電荷的脂質分子進行穿孔的行為，且孔洞大小與胜肽濃度有關，而對於帶負電的脂質分子，會先產生直徑約 5 nm 的孔洞，接著進行膜融合 (fusion) 而結束螢光洩漏<sup>29</sup>。2008 年 Yu 等人利用螢光相關光譜技術 (fluorescence correlation spectroscopy) 觀察單層小微脂粒的螢光洩漏與擴散情形，他們發現蜂毒胜肽會在膜上產生孔洞外，同時會有脂質體聚集 (aggregation) 的現象；他們也對不同脂質長鏈的飽和度做比較，發現蜂毒胜肽的作用不受碳鏈飽和度影響<sup>30</sup>。2007 年 Mally 等人利用相位對比顯微技術 (phase-contrast microscopy) 探討單一巨大單層脂質體與蜂毒胜肽之間的作用，並測試不同胜肽濃度的影響，她們依照作用結果將濃度分為四個範圍，低濃度下，胜肽會吸附在膜上並有雙體 (dimer) 形成，雙體進行穿膜動作後會將胜肽分配到脂雙層的內層，進而引起單體持續吸附在膜上，且可觀察到膜外有少數突起物形成；增加胜肽濃度，孔洞數量增加，脂質體內的物質流失現象明顯，且脂質體粒徑有縮小的趨勢；再提高胜肽濃度，脂質體會因內外擾流的流量相差很大而完全崩解；當濃度高過 12  $\mu\text{g/ml}$  時，形成的孔洞大到足以承受較強的流量衝擊，且流出速度大於流入速度，就導致脂質體即使

在高濃度胜肽下能保持密封不崩解，也因為膜表面持續有胜肽穿刺，脂質體的表面積會越來越大<sup>31</sup>。



### 1-3 研究動機與目標

對於蜂毒胜肽作用在細胞膜上的機制，多數文獻支持 barrel-stave model，它會在穿透膜進而形成孔洞，造成細胞內外液體相通，胞內物質外流進一步導致細胞死亡。過去的研究方法，著重在細胞膜與蜂毒胜肽的定性分析，如 oriented circular dichroism (OCD)、NMR、optical rotatory dispersion (ORD)、lamellar X-ray diffraction 等，與觀測單層小微脂粒 (small unilamellar vesicles) 的螢光變化情形。雖然這些方法可提供蜂毒胜肽的結構、位向、細胞膜厚度的資訊，與脂質膜通透性的變化，但針對孔洞形成的方式與過程並不完全清楚，所以我們想要針對單一巨大單層脂質體 (giant lamellar vesicle) 與蜂毒胜肽之間的反應做即時觀測，來得到孔洞形成的資訊。

另外，細胞的屏障——細胞膜，主要由脂質、蛋白質、醣類組成，並將細胞質與外界環境隔開。膜上嵌有許多功能不同的蛋白質與特殊醣類，負責細胞許多重要的生理機能：離子通道的開關、物質運送、能量轉換、細胞分裂、細胞融合、胞吞、胞吐、細胞識別、細胞免疫、神經傳導、和代謝調控等。因此，適當的流動性對細胞能否表現正常功能而言非常重要。我們猜測，當蜂毒胜肽吸附到細胞膜上會影響其流動性，改變許多受體和酵素的反應性，最後導致細胞失去生理功能，引起細胞死亡。

細胞膜上除了脂質分子外，還有蛋白質、醣類等成分，會增加實驗的複雜性，而脂質體 (liposome) 的組成單純，成分與性質也與細胞膜相近，很適合做為研究細胞膜行為的模型。為了釐清胜肽分子穿膜的過程，並且模擬真實細胞大小，我們選擇直徑約 20~30  $\mu\text{m}$  的脂質體來作為實驗模型。

在本論文中，我們設計了兩個部份的實驗：第一部份主要在觀測細胞膜通透性的變化，實驗設計如圖 1-3。有別於文獻上觀察包裹高濃度螢光分子的脂質體，受到蜂毒胜肽攻擊後螢光分子洩漏的情形，我們將內部單純的脂質體置入高

濃度的羧基螢光素 (CF) 溶液中，如圖 1-3 (A)，並利用光路中共聚焦 (confocal) 的設計，觀察在受到蜂毒胜肽攻擊後，細胞膜產生孔洞或缺陷時，洩漏進脂質體內的螢光分子在中心聚焦體積被偵測到的螢光強度變化，如圖 1-3 (B)，亦即，可得到脂質體內單點螢光變化的情形。我們測試不同蜂毒胜肽濃度作用在脂質體，聚焦體積內螢光隨時間的變化，並對螢光增加的情形做分析，希望可以由分析結果推論出蜂毒胜肽的作用方式。我們也對樣品進行共聚焦顯微鏡螢光影像的量測，提供我們單一平面螢光變化的資訊。

第二部份為細胞膜流動性的測量，實驗設計如圖 1-4。當溶液中蜂毒胜肽吸附到細胞膜上，會影響細胞膜流動性，如圖 1-4 (A)。我們在脂質體上嵌入類脂質染料 DiD 作為細胞膜上的螢光標的物，如圖 1-4 (B)，並利用螢光相關光譜技術，測量在偵測體積內螢光分子在膜平面上的移動情形。當細胞膜受蜂毒胜肽攻擊時，膜的流動情形會經由螢光分子的移動而表現出來，螢光分子通過偵測體積時會產生螢光訊號，將收取的螢光訊號經過二維相關函數

$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} + 1$  的計算，可以直接得到螢光分子的擴散時間，再經二維

擴散公式  $D = \frac{r_0^2}{4\tau_{diff}}$  換算，可得到螢光分子的擴散常數，反映出細胞膜的流動性

大小。

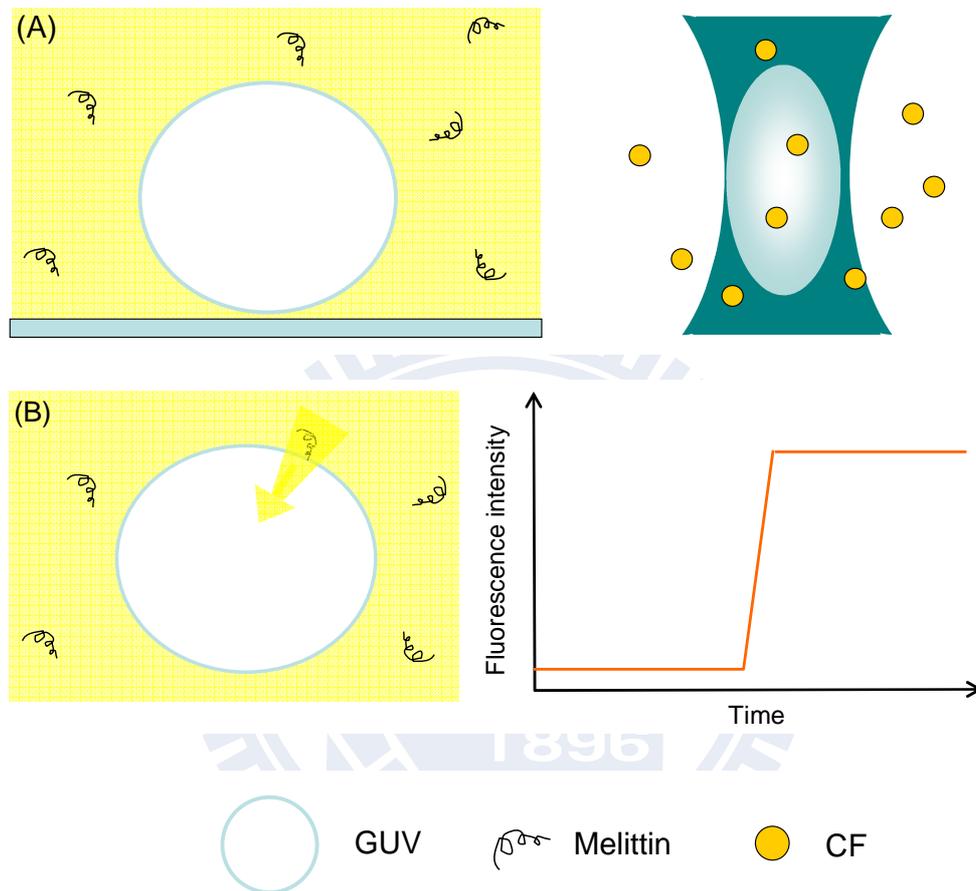


圖 1-3 細胞膜通透性實驗設計。

(A) 我們將內部單純的脂質體置入高濃度的螢光溶液中，並將激發光的偵測體積 (綠色區域) 置於脂質體的中央，當螢光分子 (CF) 洩漏進入脂質體內部，即會被偵測到。(B) 當細胞膜受蜂毒胜肽攻擊時，由於膜通透性改變，外部的螢光分子會進入脂質體內，擴散至脂質體中央即被偵測，此時會觀察到螢光訊號上升。

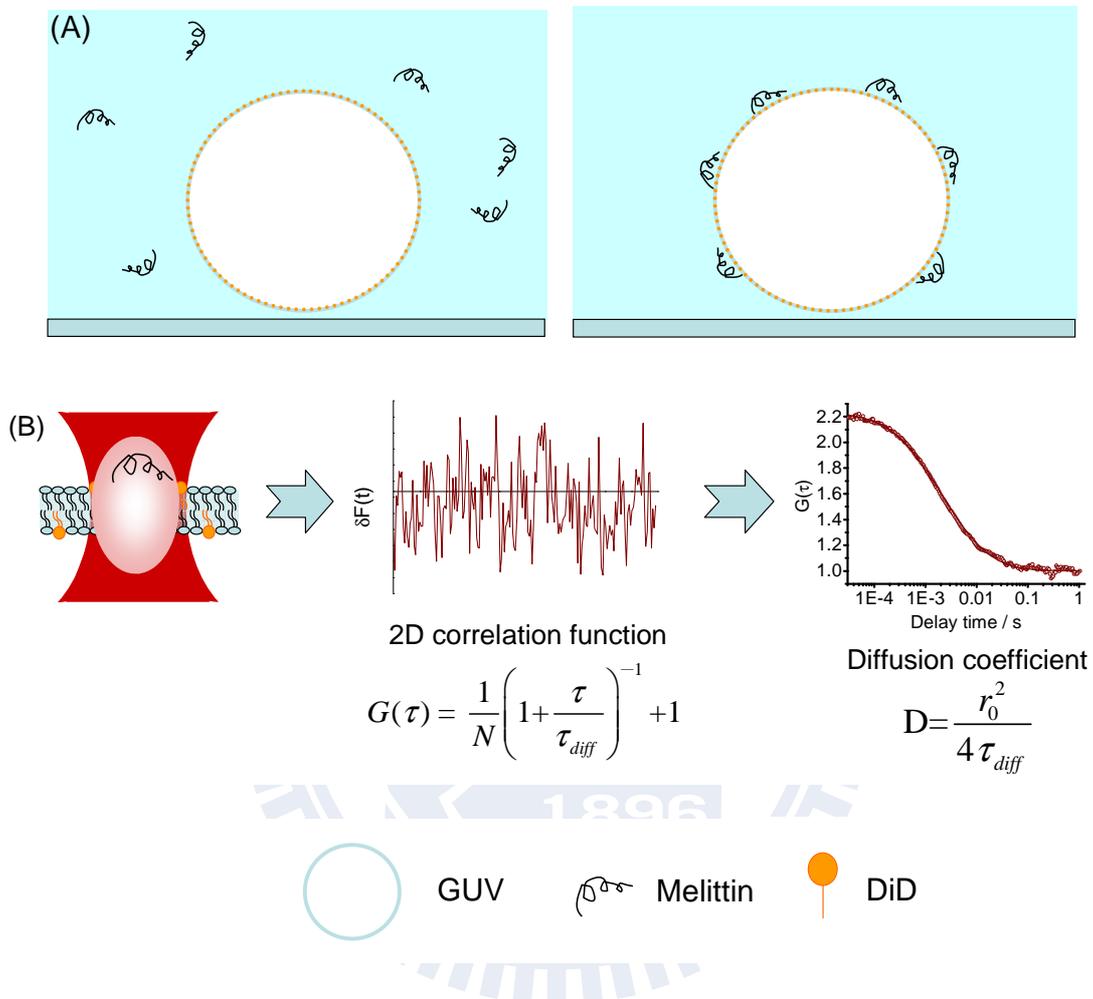


圖 1-4 細胞膜流動性實驗設計。

(A) 溶液中的蜂毒胜肽吸附到細胞膜上時，會改變細胞膜流動性。(B) 我們在脂質體的膜嵌入類脂質染料 (DiD) 作為螢光標的物，並將激發光的偵測體積 (紅色區域) 置於細胞膜上。當細胞膜受蜂毒胜肽攻擊時，膜的流動情形會經由螢光分子的移動而表現出來，螢光分子通過偵測體積時會產生訊號，將收取的螢光訊號經過相關函數的計算，可以直接得到細胞膜的擴散時間，再經擴散公式換算，可得到螢光分子的擴散常數，反映出細胞膜的流動性大小。

## 第二章、研究方法

### 2-1 測量系統

#### 2-1-1 共聚焦單點螢光系統

測量單點螢光變化實驗部份使用的是自行架設的測量系統，如圖 2-1。做為激發光源的半導體雷射 (cyan laser, 488 nm, PC13589, Newport, U.S.A.) 經自組裝的空間濾波器 (spatial filter) 除去空間中的光雜訊 (光斑)，來得到較好的光束品質 (beam profile)，與光徑擴大器放大光束，並填滿物鏡的背面孔徑 (back aperture)，使得高 N.A. 值物鏡可發揮最佳的聚光效果。光徑被放大的激發光經第一片二色鏡 (dichroic mirror, FF 500 / 646, Semrock, U.S.A.) 反射進入倒立式光學顯微鏡 (inverted microscope, IX71, Olympus, Japan)，再經顯微鏡內的第二片二色鏡 (dichroic mirror, FF735-Di01, Semrock, U.S.A.) 將光導至浸水式物鏡 (water immersion objective, UPLSAPO 60XW, N.A.=1.20, Olympus, Japan) 聚焦激發樣品。樣品放出的螢光訊號再由同一物鏡收集，沿著原光路通過 FF 500 / 646，並經濾片 (LP02-488RU-25, Semrock, U.S.A.) 除去前面濾片未過濾掉的雷射光，與波段穿越濾光鏡 (band-pass filter, D545/90m, Chroma, U.S.A.) 收集波長 500 nm 到 590 nm 的螢光。此波段螢光經焦距為 30 公分的透鏡聚焦到作為共聚焦針孔的光纖上 (孔徑為 50  $\mu\text{m}$ ，N.A.=0.22，運作波長在 400-700 nm)，最後由光電倍增管 (photomultiplier tube, H8249-001, Hamamatsu, Japan) 收取螢光。為了增加訊號雜訊比 (signal-to-noise ratio)，我們在光路中加上一組光學阻斷器 (optical chopper, SR540, Stanford Research System, U.S.A.) 與鎖相放大器 (lock-in amplifier, SR850, SRS, U.S.A.) 配合，而光電倍增管輸出的電壓訊號經此放大器轉換後傳至電腦中的訊號擷取卡 (data acquisition board, PCI-6221, National

Instruments, U.S.A.)，由儀控程式 Labview (National Instruments, U.S.A.) 記錄。考慮到樣品受雷射功率引起的螢光漂白、光電倍增管的光量負荷、鎖相放大器的電壓負載、與訊雜比的因素，各儀器的設定參數如下：雷射功率為 13  $\mu\text{W}$ ，光電倍增管的增益輸出 (gain) 為 0.83；鎖相放大器的靈敏度 (sensitivity) 為 0.5 V、時間常數 (time constant) 為 100 ms、過濾器 (filter) 為 24 dB/oct；Labview 程式紀錄的 pixel time 為 150 ms。此系統中雷射、各濾片與染料的特性光譜如圖 2-2。

我們在顯微鏡上方設置一組鹵素燈 (U-LH-100L3, Olympus, Japan) 做為亮視野影像的燈源，以避開螢光收取範圍的前提下，於光源出口處放置長波穿越濾光鏡 (long-pass filter, FGL780S, Thorlabs, U.S.A.)，讓波長 780 nm 以上的光通過物鏡與 FF735-Di01，到達電荷耦合元件 (charge-coupled device, Wat-902B, Watec, Japan) 而形成亮視野影像，與前述實驗進行同步觀測。

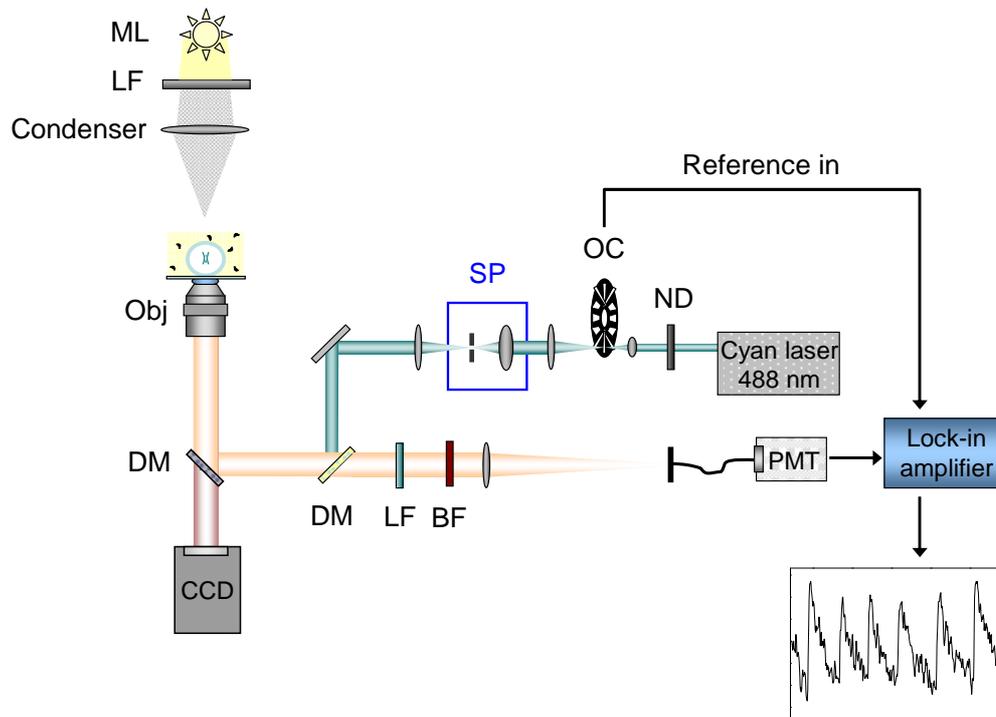


圖 2-1 自行組裝的共聚焦螢光顯微鏡系統架設圖。

ND: neutral density filter; OC: optical chopper; SP: spatial filter; DM: dichroic mirror; Obj: water immersion objective; ML: mercury lamp; LF: long-pass filter; BF: band-pass filter.

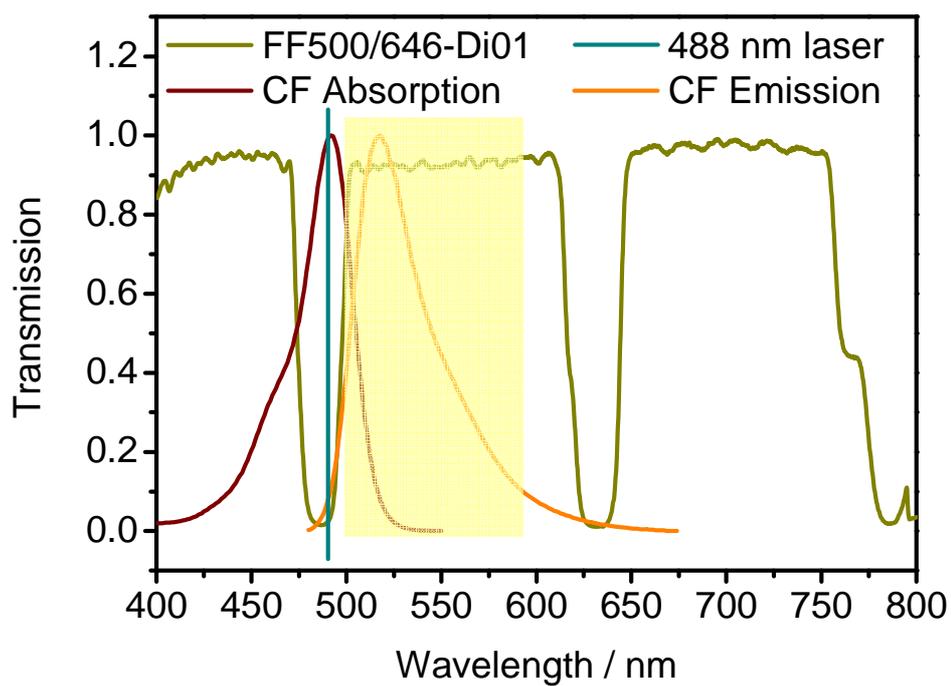


圖 2-2 共聚焦螢光顯微鏡系統中雷射、各濾片、與染料之特性光譜。

羧基螢光素的最大吸收與放射分別為 492 nm 與 517 nm。黃色區塊為偵測器收取的螢光範圍。

## 2-1-2 共聚焦螢光影像系統

除了自行架設的共聚焦系統，我們也利用 FV300 共聚焦顯微鏡系統 (confocal microscope, Olympus, Japan) 來得到螢光影像，使用的光源為氬離子雷射 (argon ion laser, 488 nm, CVI Melles Griot, U.S.A.)，搭配 60X 浸水式物鏡聚焦激發樣品。樣品的螢光經過共焦光圈 (confocal aperture) 到達偵測器 (R3896, Hamamatsu, Japan)。掃描時雷射強度為  $100 \mu\text{W}$ ，共焦光圈直徑為  $60 \mu\text{m}$ ，搭配二色鏡 (DM570, Olympus, Japan) 與長波穿透濾片 (BA510IF, Olympus, Japan) 收取波長 510 nm 到 570 nm 的螢光，掃描的影像範圍約  $23.5 \mu\text{m} \times 23.5 \mu\text{m}$  ( $256 \text{ pixels} \times 256 \text{ pixels}$ )，單張掃描時間為 1.65 s，連續掃瞄的時間間距為 0.5 s。



### 2-1-3 螢光相關光譜系統

另外，我們也自行架設了一套螢光相關光譜系統，如圖 2-3，量測蜂毒肽與膜作用後的細胞膜流動性變化。系統的架設與前述的單點螢光測量系統類似，簡述如下。以波長為 632.8 nm 的氦氖雷射 (1137P, JDS Uniphase, U.S.A.) 做為激發光源，經一組空間濾波器與光徑擴大器後，激發光由二色鏡 FF 500 / 646 反射進入倒立式光學顯微鏡，樣品放出的螢光訊號延原光路穿過二色鏡，並經焦距為 30 公分的透鏡聚焦到共焦針孔上，聚焦前我們利用分光鏡 (50/50 beam splitter, EBS1, Thorlabs, U.S.A.) 將螢光平均分成兩道路徑，並加上波段穿越濾光鏡 (HQ 680/60m, Chroma, U.S.A.) 蒐集樣品螢光。我們將共焦針孔孔徑設為 50  $\mu\text{m}$ ，目的在於製造出測量螢光分子擴散的偵測體積 (focal volume)。最後由雪崩光電二極管 (avalanched photodiode, SPCM-AQR-15-FC, PerkinElmer, U.S.A.) 收取螢光。雪崩光電二極管會將收到的光子訊號轉成電子脈衝訊號，並經時間相關單光子計數器 (Flex02-01D, Correlator, U.S.A.) 計算螢光分子的相關曲線。另外，我們也利用一組電動移動移動平台 (scanning stage) 做細胞膜位置的相關曲線掃描。此系統中雷射、各濾片與染料特性光譜如圖 2-4。

螢光相關光譜進行樣品量測前，需先進行系統優化 (optimization) 與校正，得知測量時的聚焦體積大小與形狀。

#### (1) 螢光相關光譜技術的優化 (optimize) 與系統校正

在系統優化的過程中，以光行進的方向為軸向，我們先利用螢光染料對收光處不同軸向位置作強度的掃描，在強度較大的區域再作細部的系統值掃描，最後針對玻片厚度微調物鏡上的修正環 (correction ring)，根據參考文獻，理想的螢光相關光譜系統，聚焦點長短軸比 ( $r/z$ ) 為  $1/6 - 1/3$ <sup>32</sup>。

我們量取已知擴散係數的染料之相關曲線，計算得到染料的擴散時間與聚焦

點長短軸比 ( $r/z$ )，進而算出聚焦點短軸半徑 ( $r$ ) 與偵測體積 (focal volume)。測量未知樣品的擴散與流動時，藉由共同的測量體積，與測得的擴散時間 (三維或二維空間中)，換算出未知樣品的擴散係數。

以雷射功率 13  $\mu\text{W}$  激發 1 nM Alexa633 水溶液 (溶劑為 PBS 緩衝溶液) 作系統校正，其擴散係數為  $1.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ，經過自相關函數 (autocorrelation

function)  $G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} \left[ 1 + \left( \frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right]^{-1/2} + 1$  擬合，算出實驗系統的  $r/z =$

0.21， $\tau_{diff} = 8.77 \times 10^{-5} \text{ s}$ ，再利用關係式  $\tau_{diff} = \frac{r_0^2}{4D}$  求得  $r_0 = 218 \text{ nm}$ 。Alexa633 的

自相關函數與擬合結果如圖 2-5 所示。

## (2) 樣品的螢光相關光譜

藉由標定在細胞膜上類脂質染料的流動速度，反映細胞膜的流動性。考慮細胞膜曲率、細胞膜厚度與偵測體積大小，膜上的染料分子在偵測體積內可視為平

面的運動。我們用二維的螢光相關式  $G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} + 1$  擬合得到染料分

子在偵測體積內擴散時間，且由前述的校正步驟可以知道偵測體積在膜上的半徑

$r_0 = 218 \text{ nm}$ ，再利用橫向擴散關係式  $\tau_{diff} = \frac{r_0^2}{4D}$  可以算出染料分子的擴散常數。

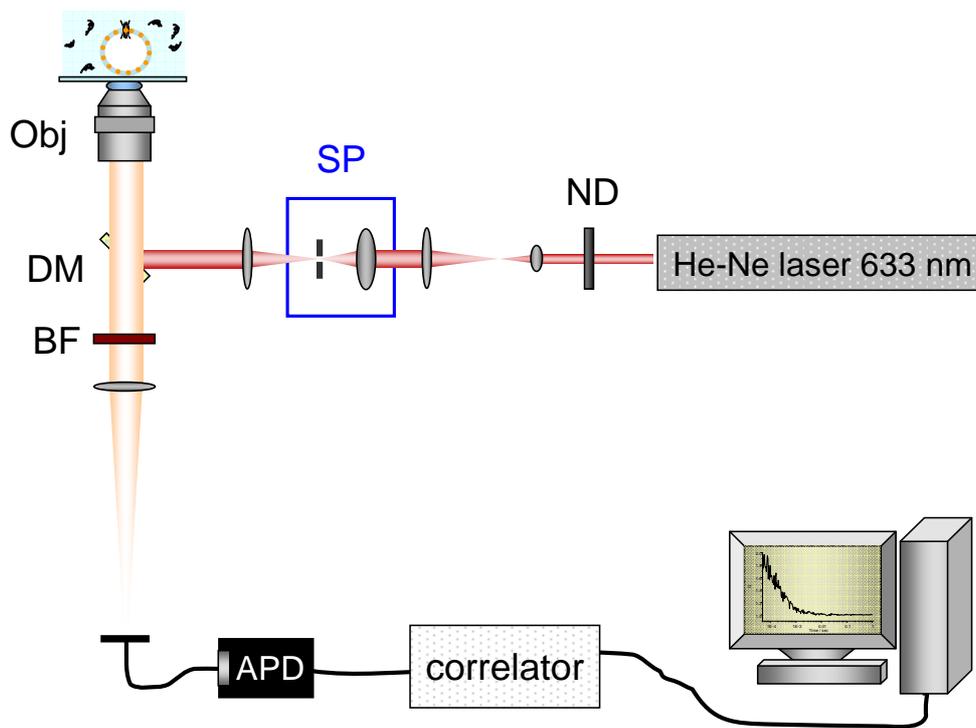


圖 2-3 自行組裝的螢光相關光譜系統架設圖。

ND: neutral density filter; SP: spatial filter; DM: dichroic mirror; Obj: water immersion objective; BF: band-pass filter.

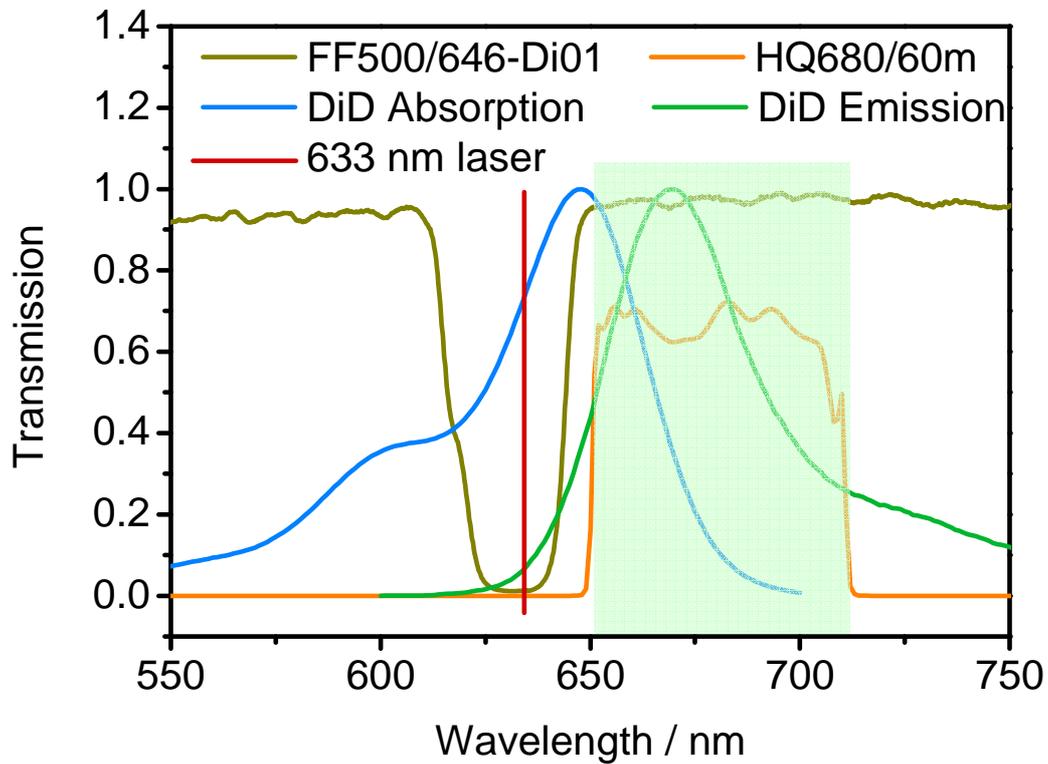


圖 2-4 螢光相關光譜系統之雷射光源、各濾片與染料之特性光譜。

類脂質染料 DiD 的最大吸收與放射分別為 648 nm 與 670 nm。綠色區塊為偵測器收取的螢光範圍。

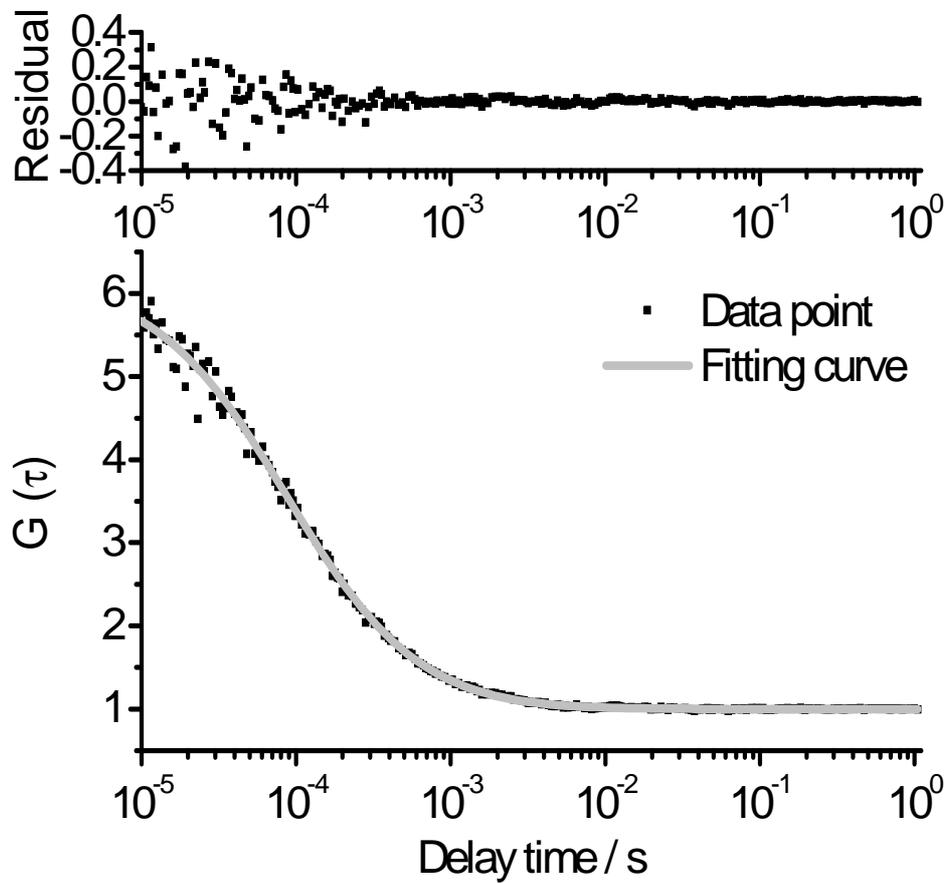


圖 2-5 Alexa633 的自相關函數與擬合結果。

利用 1 nM Alexa633 的 PBS 水溶液作系統校正，其擴散係數為  $1.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

<sup>33</sup>，經過自相關函數 (autocorrelation function)

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} \left[ 1 + \left( \frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right]^{-1/2} + 1$$

擬合，算出實驗系統的  $r/z = 0.21$ ， $\tau_{diff}$

$= 8.77 \times 10^{-5} \text{ s}$ ，再利用關係式  $\tau_{diff} = \frac{r_0^2}{4D}$  求得  $r_0 = 218 \text{ nm}$ 。

## 2-2 樣品製備

我們利用電生成法 (electroformation) 製作實驗所需的脂質體。這種方法有材料簡單、製作過程容易、空間限制小的優點，自 1986 年 Angelova 提出之後<sup>34</sup>，對於製作粒徑較大的脂質體 (giant unilamellar vesicles, GUVs)，是廣為使用的方法。實驗中，產物的粒徑主要分佈在 10-30  $\mu\text{m}$  的範圍。製作過程簡述如下並以圖 2-6 表示：

將儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  的 5 mM POPC 脂質溶液回溫備用

(溶劑體積 氯仿:甲醇 = 9:1)



將 ITO (Indium Tin Oxide) 玻璃用甲醇擦拭乾淨，靜待風乾後，在導電面用銅漆膠帶貼上電線



分別在 ITO 玻璃導電面上滴 20  $\mu\text{L}$  的脂質溶液，使之均勻分布在玻片上



(◎)用氮氣將玻璃上的溶劑吹乾，接著抽真空靜置 1 小時，讓殘餘的溶劑完全揮發



取一個中空直徑為 20 mm 的墊片 (chamber, 664113, Grace Bio-Labs, U.S.A.) 貼在玻片導電面上，讓乾燥的脂質置於墊片中間，形成製備微脂體時所需的空間



在墊片內注入 300  $\mu\text{L}$  的 0.2 M 葡萄糖溶液，接著另一片玻璃以導電面向下的方式蓋上



將波形產生器 (function generator, SFG-2104, Instek, U.S.A.) 的輸出電線分別接

到上下兩玻片的電線上



開啟波形產生器，以 10 Hz、3V(peak-to-peak)、sin wave、2 h 的條件通電



關閉波形產生器，移除上玻片，收集墊片內的微脂體溶液至褐色微量離心管內備用。

螢光相關顯微技術使用的樣品，須在膜上嵌入類脂質染料 DiD，製作方法與前述過程類似：5 mM POPC 與 10 nM DiD 回溫後，分別取體積 40  $\mu\text{L}$  與 80  $\mu\text{L}$  混合均勻，然後塗佈在 ITO 玻片上，接著從記號(◎)開始的步驟皆相同。



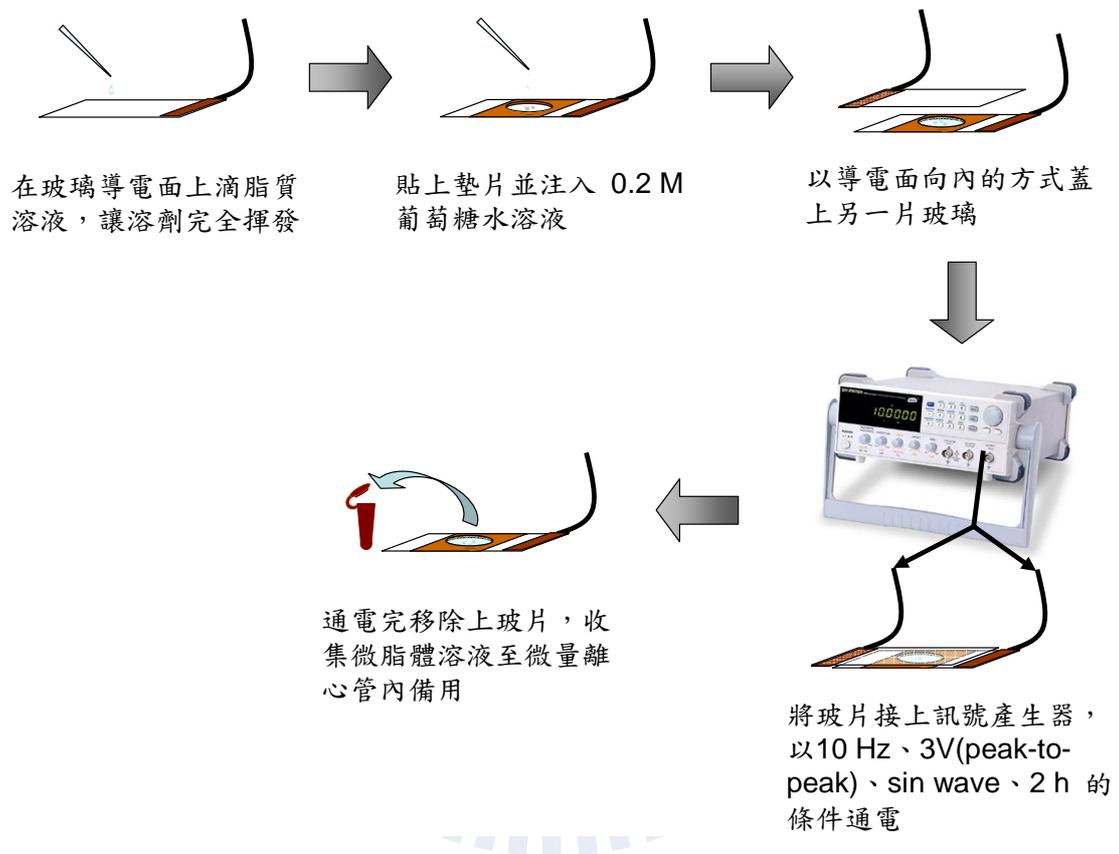


圖 2-6 脂質體製備流程。

## 2-3 混合脂質體與不同濃度蜂毒胜肽的樣品製備與量測

填裝樣品前，先用甲醇將製備樣品用的玻 (cover glass, 22×50 mm, thickness #1.5, 72204-04, Electron Microscopy Science, U.S.A.) 擦拭乾淨，貼上中空直徑為 9 mm 的墊片 (chamber, 664112, Grace Bio-Labs, U.S.A.)，墊片內可填裝體積為 60  $\mu\text{L}$ ，因為要即時觀察加入蜂毒胜肽的螢光變化，所以在配置樣品時需預留蜂毒胜肽的體積，待樣品置於顯微鏡上再加入進行觀察。除了脂質體在製作過程中使用 0.2 M 葡萄糖水溶液外，稀釋蜂毒胜肽、稀釋染料皆是使用 0.1 M NaCl 水溶液，這種情況下，脂質體內外的密度與折射率不同，它會自然沉降在底部，我們也容易觀察到脂質體的輪廓。

### 2-3-1 共聚焦單點螢光系統與共聚焦螢光影像系統

在此部份實驗中，蜂毒胜肽加入的濃度分別為 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、0.02  $\mu\text{M}$ 、0.05  $\mu\text{M}$ 、0.1  $\mu\text{M}$ 、0.2  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$ 。樣品混合步驟如下：取 10  $\mu\text{L}$  脂質體溶液到墊片內，加入計算好濃度的羧基螢光素水溶液，使得最後濃度為 8  $\mu\text{M}$ ，將樣品移至顯微鏡上，並靜置 5 分鐘待脂質體受重力沉降，以移液管吸取要加入的蜂毒胜肽溶液，輕壓移液管使溶液在吸尖端形成水滴狀，緩緩靠近樣品，讓水滴底部碰觸樣品溶液，使得水滴自然溶於樣品溶液並開始計時，此步驟需小心不可讓管尖端浸入樣品，會產生液體的擾動進而讓脂質體產生漂動。最後輕輕蓋上蓋玻片，確定脂質體沒有漂動，即可開始觀測脂質體的共聚焦顯微鏡影像與內部螢光變化。量測時的系統參數設定已於前面章節敘述，見 2-1-1。共聚焦顯微鏡影像使用的參數已於 2-1-2 中詳述。

## 2-3-2 螢光相關光譜系統

觀測脂質體流動性的實驗中，樣品配置與上述步驟類似，但脂質體是置於無螢光的 0.1 M NaCl 水溶液中等待沉降，再加入蜂毒胜肽，然後進行螢光相關光譜量測。測量細胞膜流動性使用的雷射功率為 13  $\mu$ W。

在溶液中沉降的脂質體，底部與玻片相接，下層膜的訊號會受玻片影響，所以我們在此部分的實驗皆選擇脂質體的上層膜作測量。從亮視野影像中，先將脂體中心點移至雷射聚焦處，然後切換亮視野，導入雷射光，將雷射焦點移至上層膜，此時會出現微弱的反射亮點，接著進行細胞膜螢光相關曲線的縱向掃描。當雷射準確聚焦在細胞膜上，會有以下幾個特徵：(1) 光子數最高，(2) 螢光粒子數最少，對應到相關曲線的振幅 (相關性) 會最大，(3) 擴散時間最短<sup>35</sup>。

每一顆脂質體皆測量 10 次，每次積分時間為 10 秒，將 10 次數據取平均即為該顆脂質體的流動性數值。若此 10 次數據中出現擬合後的相關係數 ( $R^2$ ) 低於 0.98，則捨棄該次數據，另外，若 10 次數據的標準差大於 10%，則按照與平均值差異大小的順序刪除數值，直到該顆脂質體數據的標準差小於 10%。若捨棄數量超過三個，即捨棄該顆脂質體的數值。

在此部分實驗中，我們測試不同濃度的蜂毒胜肽，分別為 0  $\mu$ M (控制組)、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M、30  $\mu$ M、40  $\mu$ M、50  $\mu$ M、60  $\mu$ M。

## 第三章、結果與討論

### 3-1 脂質體與蜂毒胜肽作用後亮視野影像變化

當細胞膜受到蜂毒胜肽攻擊，除了膜的厚度改變外，還會形成孔洞甚至破裂，為了了解蜂毒胜肽攻擊細胞時細胞膜外觀是否有變化，我們利用亮視野影像來找出線索。實驗中，我們觀察了不同蜂毒胜肽濃度、不同直徑 (20  $\mu\text{m}$  ~ 30  $\mu\text{m}$ ) 的脂質體，也發現到每個體之間的反應情形都不相同。

加入蜂毒胜肽後，部份脂質體會維持直徑大小與位置，如圖 3-1 (A)，但部份脂質體會有從原聚焦平面失焦的現象，影像上直接觀察到微脂體的輪廓變得模糊。針對失焦的現象，有三種可能：

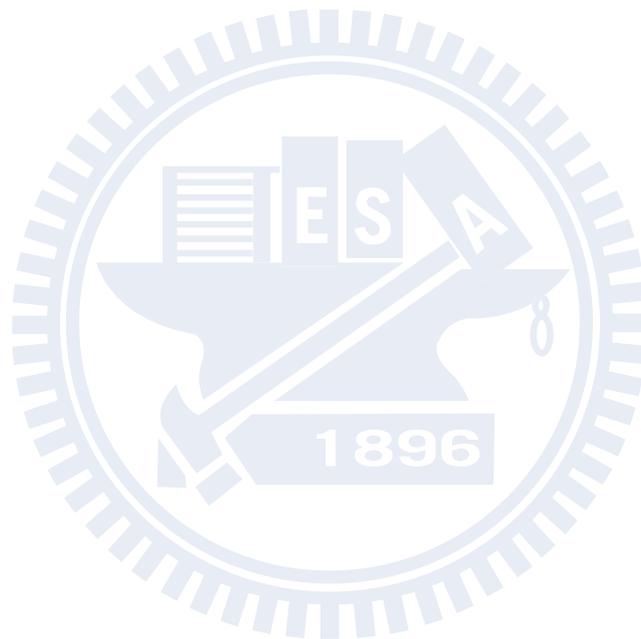
1. 脂質體的形變現象：沉降在底部的脂質體原本是球形，因為蜂毒胜肽吸附或嵌入細胞膜時，會造成原本脂質分子 (lipid) 的排列情形改變，進而影響膜的堅固性，讓脂質體變扁呈現橢圓形，在原聚焦平面的影像因此變模糊。

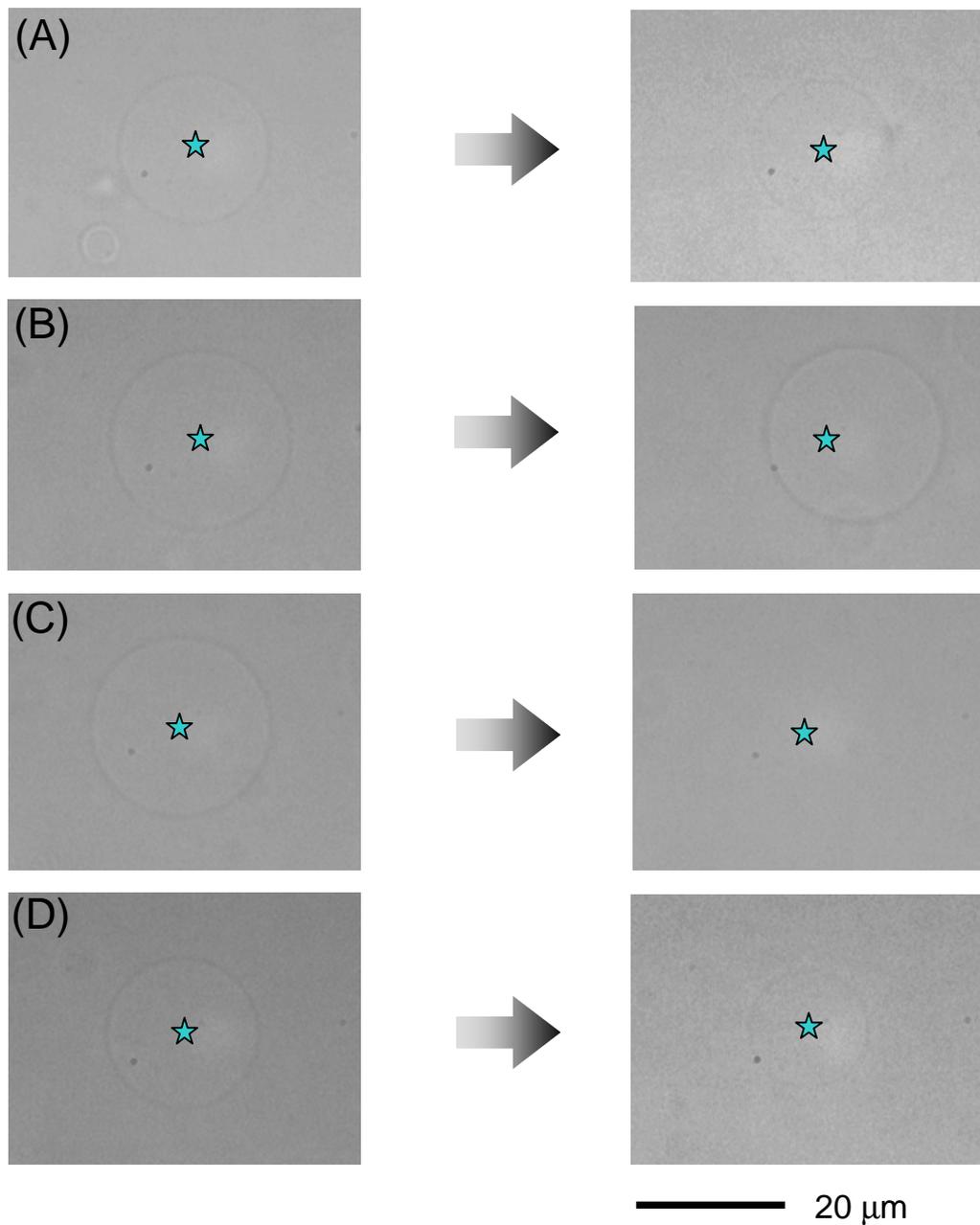
2. 脂質體的大小改變：與上述的形變不同，脂質體可能會有部份脂質分子脫離細胞膜情況發生，為了填補減少的脂質分子的空位，其它脂質分子會再度融合 (fusion) 而形成直徑較小的脂質體，所以原聚焦平面的影像因此變模糊，如圖 3-1 (D)。

3. 顯微鏡本身的軸向位移：此原因與樣品本身無關，而是觀測儀器的缺陷，當我們進行調整物鏡在軸向位置的動作時，同時涵蓋數個機械齒輪的運轉，在我們調整到適當高度，並移除加在齒輪的外力後，理論上會停止移動並固定，但實際上，有可能產生些微的鬆動，使得軸向位置偏移，所以原聚焦平面的影像因此變模糊。

除了軸向的位移，脂質體也會出現橫向的位移，還有抖動後伴隨橫向位移的現象，如圖 3-1 (B)，推測是當蜂毒胜肽吸附並穿透細胞膜時，蜂毒胜肽的結構

與脂雙層結構無法緊密排列，在穿透的地方會形成缺陷，膜上的缺陷瞬間受到內外液體交換的擾流推擠（抖動），順著擾流推力開始出現橫向位移的情形。若膜上同時有多個蜂毒胜肽吸附，或擾流很劇烈的情況下，脂質體也會在瞬間破裂，如圖 3-1 (C)。我們觀測到的結果與 Mally 等人在 2007 所觀測到的現象相當接近類似<sup>31</sup>。





**圖 3-1 脂質體與蜂毒胜肽作用後亮視野影像變化。**

(A) 靜止不動，脂質體半徑為  $20\ \mu\text{m}$ 。(B) 平面上位移，脂質體半徑為  $24\ \mu\text{m}$ 。

(C) 破裂，脂質體半徑為  $24\ \mu\text{m}$ 。(D) 半徑變小，脂質體半徑變化前為  $20\ \mu\text{m}$ ，

變化後為  $15\ \mu\text{m}$ 。

## 3-2 脂質體與蜂毒胜肽作用後內部共聚焦螢光隨時間的變化

誠如我們在前文所提到，蜂毒胜肽吸附在細胞膜上之後，產生穿膜孔洞的過程目前並不清楚。所以我們在脂質體外放置染料，並即時觀察單一脂質體與蜂毒胜肽反應之後，內部的螢光變化情形，希望可以得到孔洞形成過程的資訊。因此，我們自行架設一套共聚焦螢光顯微系統觀察脂質體內的螢光變化，並對不同濃度的蜂毒胜肽做測試。

實驗得到的螢光強度隨時間變化，如圖 3-2 所示，列舉各蜂毒胜肽濃度的脂質體內螢光訊號：(A) 圖為未加蜂毒胜肽的時間軌跡圖。圖 3-2 (B)-(F) 為 0.02  $\mu\text{M}$ -0.5  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽下的時間軌跡圖。我們可以看到，在低濃度下，即使混合時間長達一小時，也不會發現脂質體內有大量螢光增強的情形。另外，從結果中我們可以發現，加入蜂毒胜肽之後，我們在脂質體中央量測到的螢光強度有呈現間歇上升的情況，且每此上升的高度都很接近，根據這些觀察，我們初步猜測蜂毒胜肽與細胞膜的作用關係有可能是單分子（蜂毒胜肽）的攻擊行為。若突峰的出現與蜂毒胜肽攻擊細胞膜的過程有關的話，藉由了解突峰之間的關聯，我們有機會了解細胞膜變化的資訊。

此部分實驗中，我們觀察單一脂質體內部的螢光變化，會得到許多突峰；同樣蜂毒胜肽濃度下，我們偵測多個脂質體內部的螢光變化情形。針對每個突峰，我們分析三個參數：上升高度、上升時間、與峰值間距（圖 3-3 (A) 中的 (a)、(b)、(c)）。分析步驟如圖 3-3 所示：

1. 上升高度 (rise height)：定義為突峰上升過程的最低點到峰頂的電壓差。
2. 上升時間 (rise time)：定義為達到上升高度所耗費的時間。
3. 峰值間距 (rise interval)：定義為相鄰兩突峰峰頂的時間差。

我們把一個突峰視為一個事件 (event)，個別進行以上三個參數的統計處理。針

對一個參數而言，在同樣蜂毒胜肽濃度下，將多個脂質體螢光變化圖中得到的所有突峰事件的參數值一一求出，並做參數值的統計圖 (histogram)，以上升高度的分析為例，如圖 3-3 (B)，再將統計結果進一步做高斯分布多峰擬合 (Gaussian multippeak fitting)，(圖 3-3 (C))，可得到該統計圖分布的峰值與半高寬 (full-width half-maximum)。我們測試不同蜂毒胜肽濃度，進行相同分析，並得到各濃度下的高斯分佈擬合結果，最後以擬合結果的半高寬視為該峰值分布的標準差，畫出濃度對應參數的高斯分布結果，如圖 3-3 (D)。例如：(C) 圖可得到單一濃度下的兩個高斯分布峰值與半高寬，我們將它繪於 (D) 圖中，即為藍帶區域所示的兩個分布。上升時間與峰值間距的所有事件參數值也是做相同的分析。每個濃度下的突峰事件總數 (n) 皆標示於各參數統計圖的圖表說明與表格中。

圖 3-4 是不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升高度統計圖，從不同濃度下統計圖的多峰擬合結果 (圖 3-7) 可以發現，上升高度的分布結果呈現近似倍數關係 (圖中粉色帶區域)，這有可能代表著單一個、兩個、或是三個蜂毒胜肽分子的攻擊行為，即也呼應我們之前提到蜂毒胜肽為單分子攻擊行為的猜測。但由圖中可以發現高斯曲線半高寬，亦即圖中的標準差，很大，有可能來自於實驗中使用的脂質體粒徑差異。由於我們在實驗中是以重力沉降的方式讓脂質體停留在玻片上，與化學方法的固定方式相比，如：胺基-羧基的鍵結，重力沉降較無法有效的固定住脂質體，所以有可能會產生輕微的漂動而影響結果分布。

圖 3-5 是不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升時間統計圖。比較不同濃度的擬合曲線結果 (圖 3-8)，上升時間可視為相同。圖 3-6 是不同蜂毒胜肽濃度下突峰峰值間距的統計結果，其高斯分布曲線擬合結果繪於圖 3-9。結果顯示當蜂毒胜肽濃度上升，峰值間距有下降的趨勢。當溶液中的蜂毒胜肽越來越多，脂質體被碰撞的機會也越多，進而會增加蜂毒胜肽吸附在脂質體上的頻率，我們就會觀測到峰值間距越來越短的現象。

實驗中，我們在控制組與實驗組皆發現螢光有大幅度的擾動情況出現，這可能是脂質體未固定，在溶液中漂動造成。另外，從螢光隨時間變化的紀錄可以發

現：在脂質體破裂之前，會有許多小幅度的突峰密集出現。且在較高濃度的蜂毒胜肽下，較容易出現螢光緩慢上升的情況。

所有的參數統計圖的擬合結果與事件總和數詳細列於表 3-1、表 3-2、表 3-3。



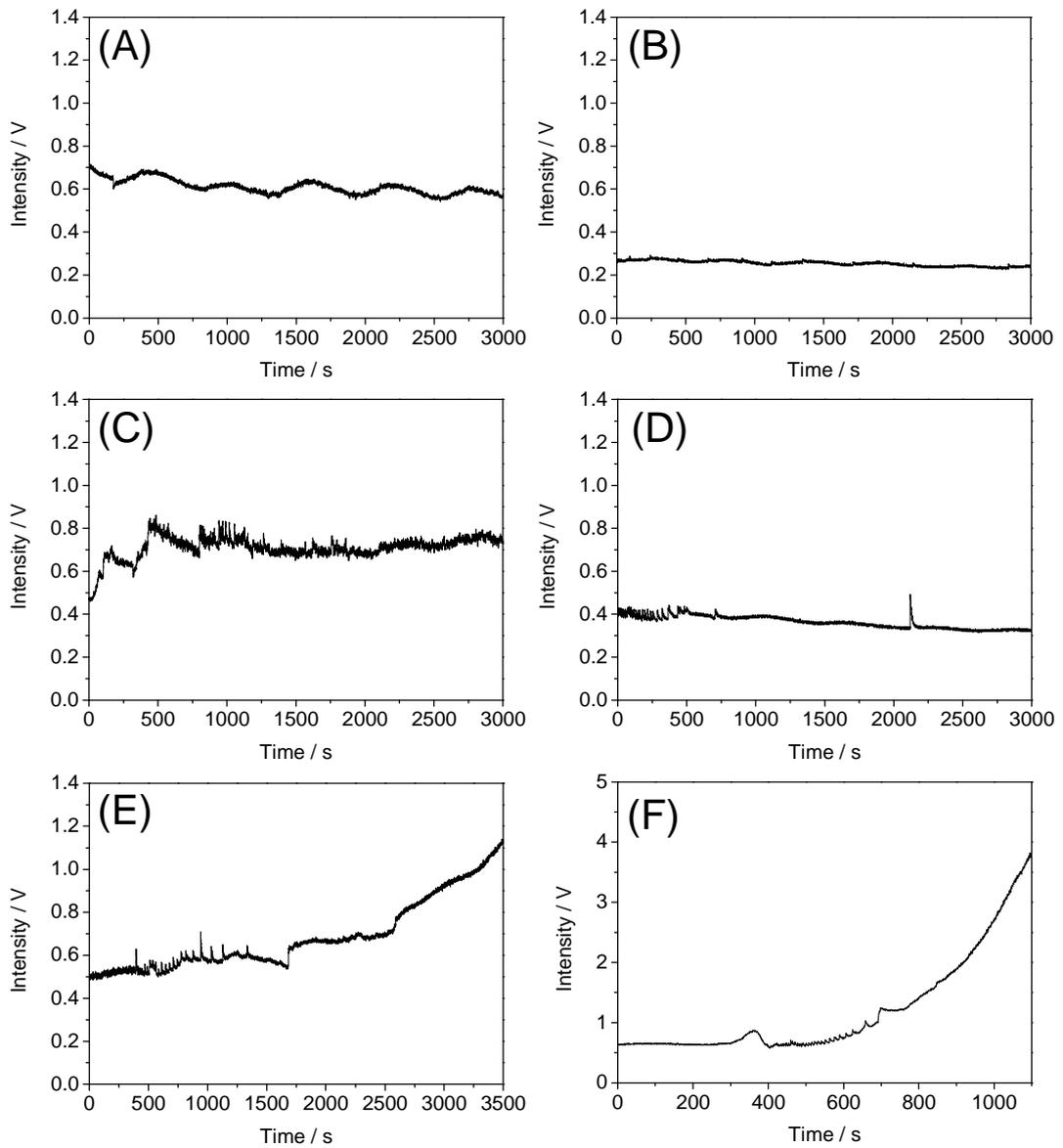


圖 3-2 不同蜂毒胜肽濃度下的單點共聚焦螢光強度隨時間變化圖。

(A) 0 M (control), (B) 0.02  $\mu\text{M}$ , (C) 0.05  $\mu\text{M}$ , (D) 0.1  $\mu\text{M}$ , (E) 0.2  $\mu\text{M}$ , (F) 0.5  $\mu\text{M}$ 。

脂質體半徑皆為 20  $\mu\text{m}$ 。

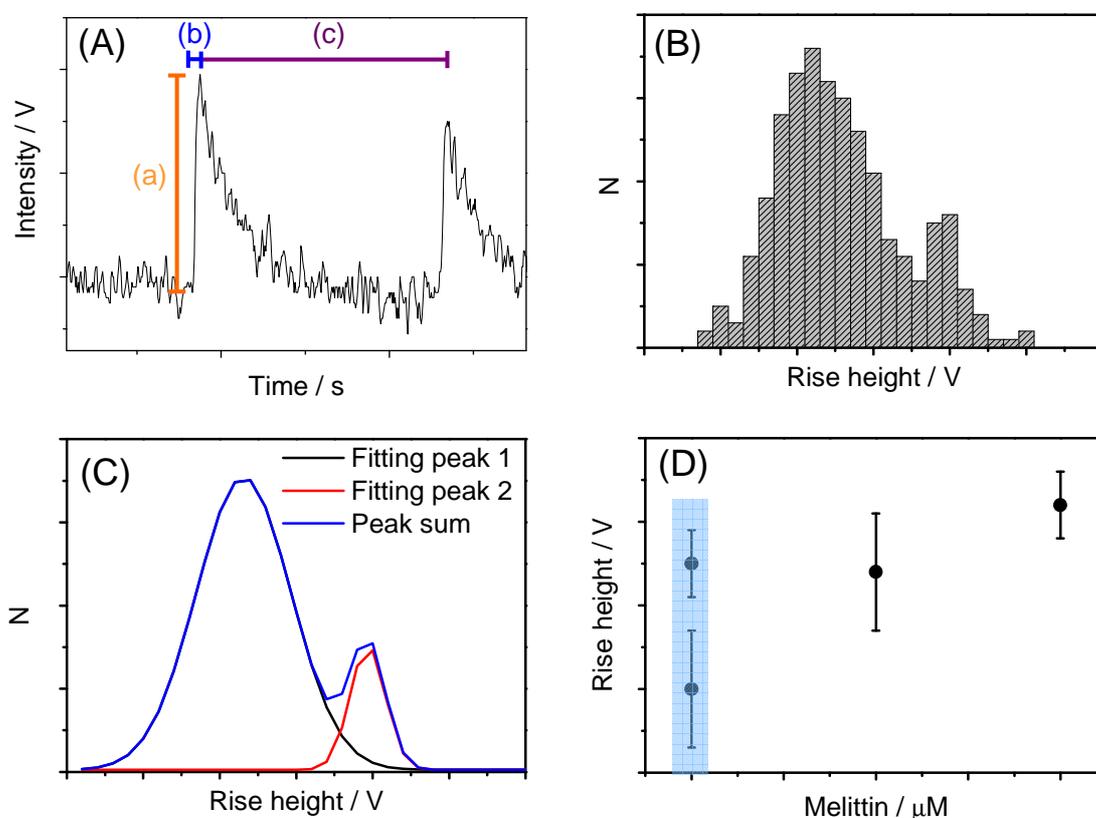


圖 3-3 突峰參數定義與統計分析示意圖。

我們觀察單一脂質體內部的螢光變化，得到許多突峰；同樣蜂毒肽濃度下，我們偵測多個脂質體內部的螢光變化情形。(A) 針對每個突峰，我們分析三個參數：上升高度、上升時間、與峰值間距。上升高度 (a) 定義為突峰上升過程的最低點到峰頂的電壓差，而此範圍所耗費的時間即為上升時間 (b)，峰值間距 (c) 定義為相鄰兩突峰峰頂的時間差。在同樣蜂毒肽濃度下，將多個脂質體螢光變化圖中得到的所有突峰參數一一求出。(B) 我們把一個突峰視為一個事件 (event)，並對三個參數下所有事件的參數值分別做統計圖。(C) 再將統計結果進一步做高斯分布多峰擬合，得到分布的峰值與半高寬。(D) 最後以擬合結果的半高寬視為該峰值分布的標準差，畫出濃度對應參數的高斯分布結果。

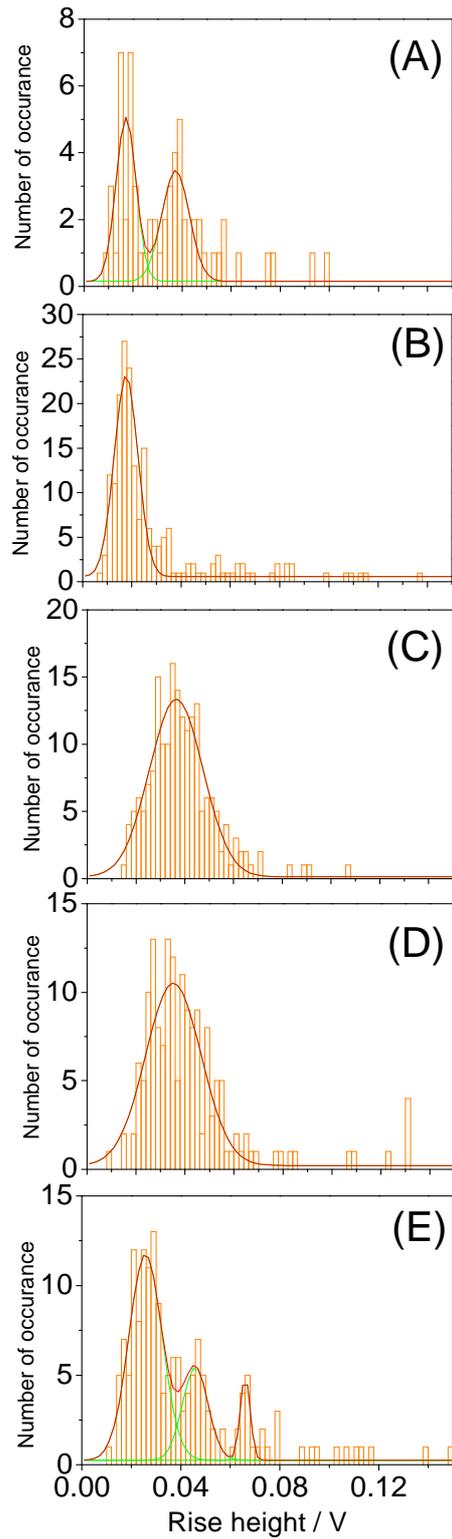


圖 3-4 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升高度 (rise height) 統計圖。

(A) 0.02  $\mu\text{M}$ ,  $n=65$  , (B) 0.05  $\mu\text{M}$ ,  $n=198$  , (C) 0.1  $\mu\text{M}$ ,  $n=196$  , (D) 0.2  $\mu\text{M}$ ,  $n=179$  ,

(E) 0.5  $\mu\text{M}$ ,  $n=192$  。

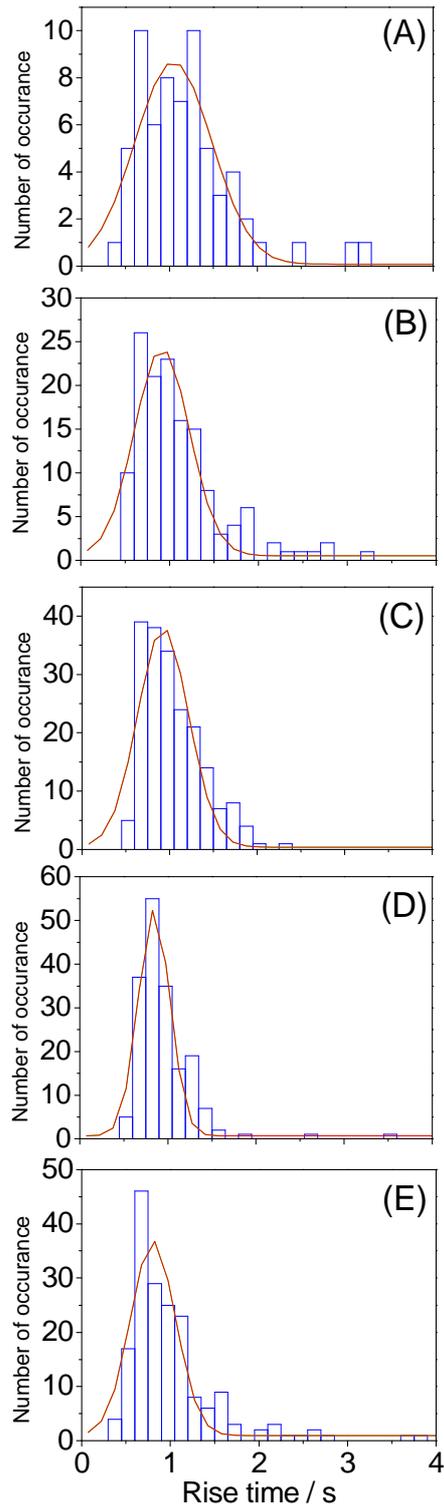


圖 3-5 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升時間 (rise time) 統計圖。

(A)  $0.02 \mu\text{M}$ ,  $n=65$  , (B)  $0.05 \mu\text{M}$ ,  $n=198$  , (C)  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $n=196$  , (D)  $0.2 \mu\text{M}$ ,  $n=179$  ,

(E)  $0.5 \mu\text{M}$ ,  $n=192$  。

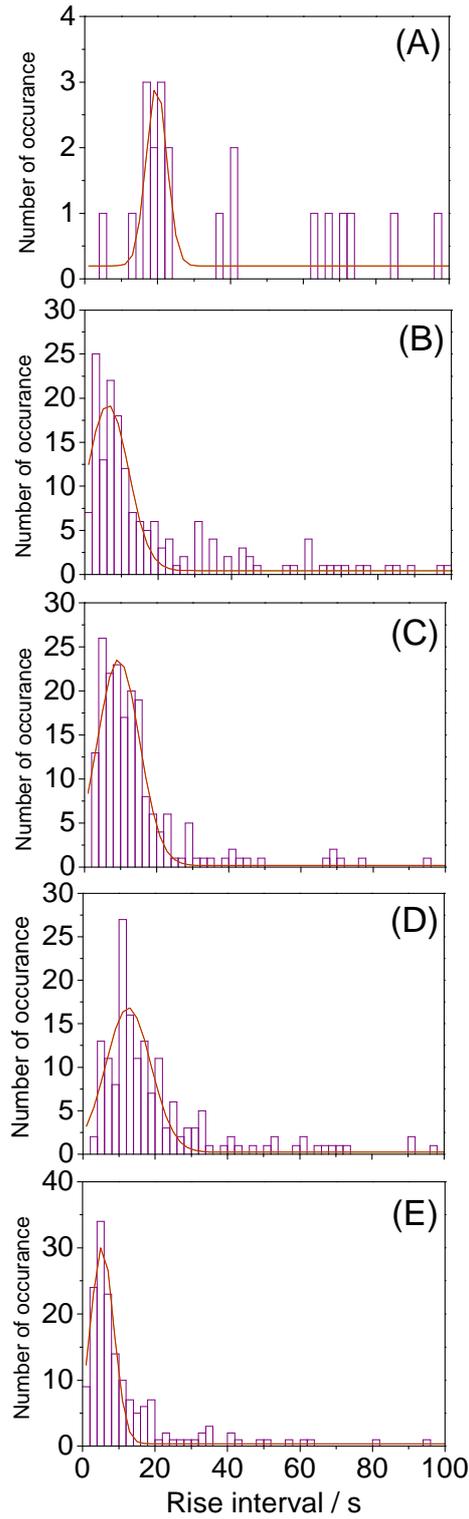


圖 3-6 不同蜂毒胜肽濃度的突峰峰值間距 (rise interval) 統計圖。

(A) 0.02  $\mu\text{M}$ , n=53 , (B) 0.05  $\mu\text{M}$ , n=188 , (C) 0.1  $\mu\text{M}$ , n=189 , (D) 0.2  $\mu\text{M}$ , n=168 ,

(E) 0.5  $\mu\text{M}$ , n=174 。

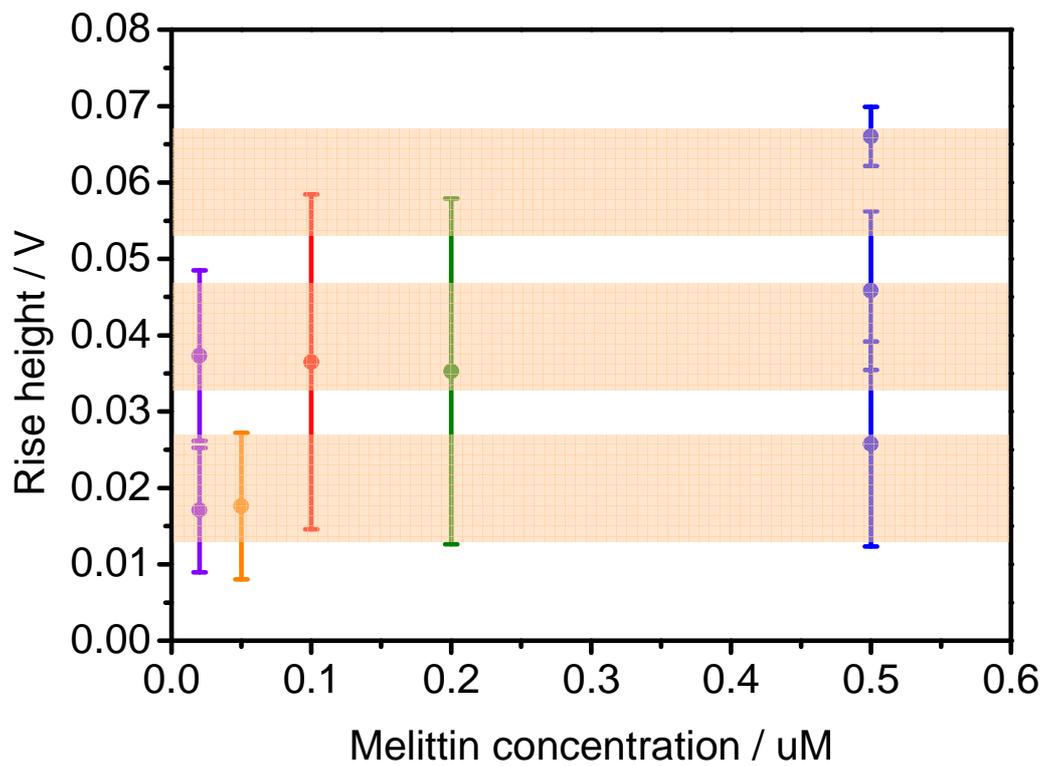


圖 3-7 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升高度之高斯多峰分布擬合結果。

上升高度的分布結果呈現近似倍數關係 (圖中粉色帶區域)，這有可能代表著單一個、兩個、或是三個峰毒胜肽分子的攻擊行為，即也呼應我們之前提到蜂毒胜肽為單分子攻擊行為的猜測。

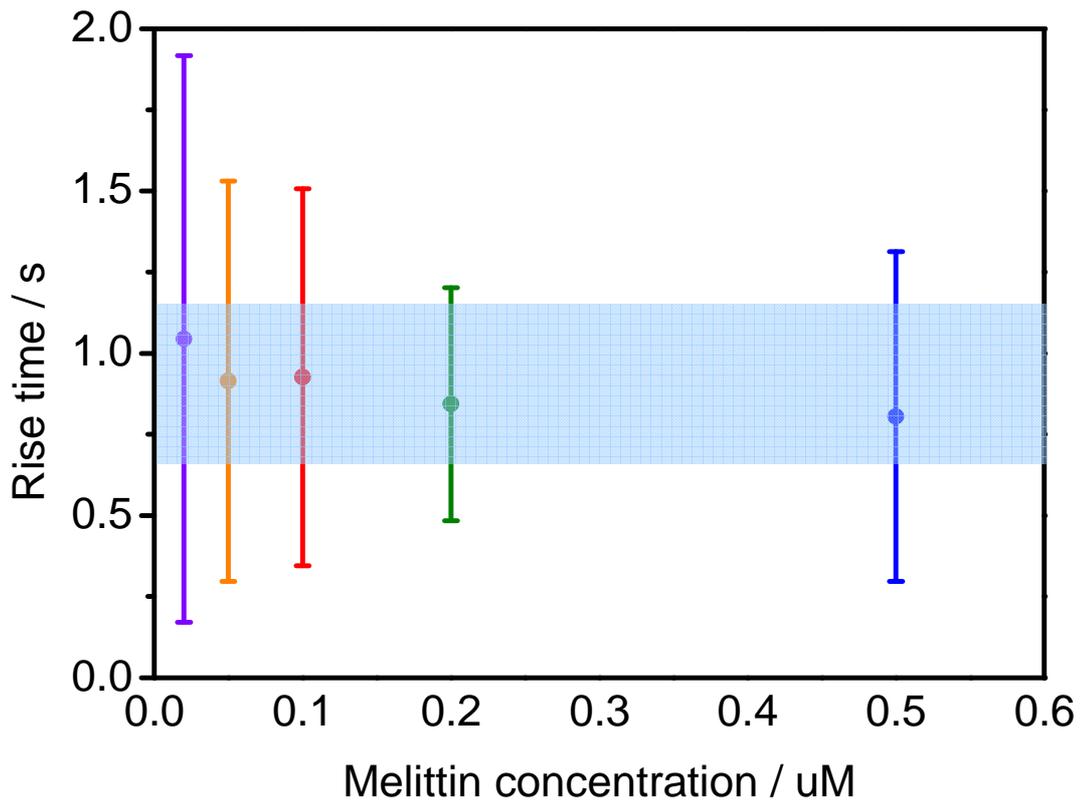


圖 3-8 不同蜂毒胜肽濃度的突峰上升時間之高斯多峰分布擬合結果。

比較不同濃度的擬合曲線結果，上升時間可視為相同。

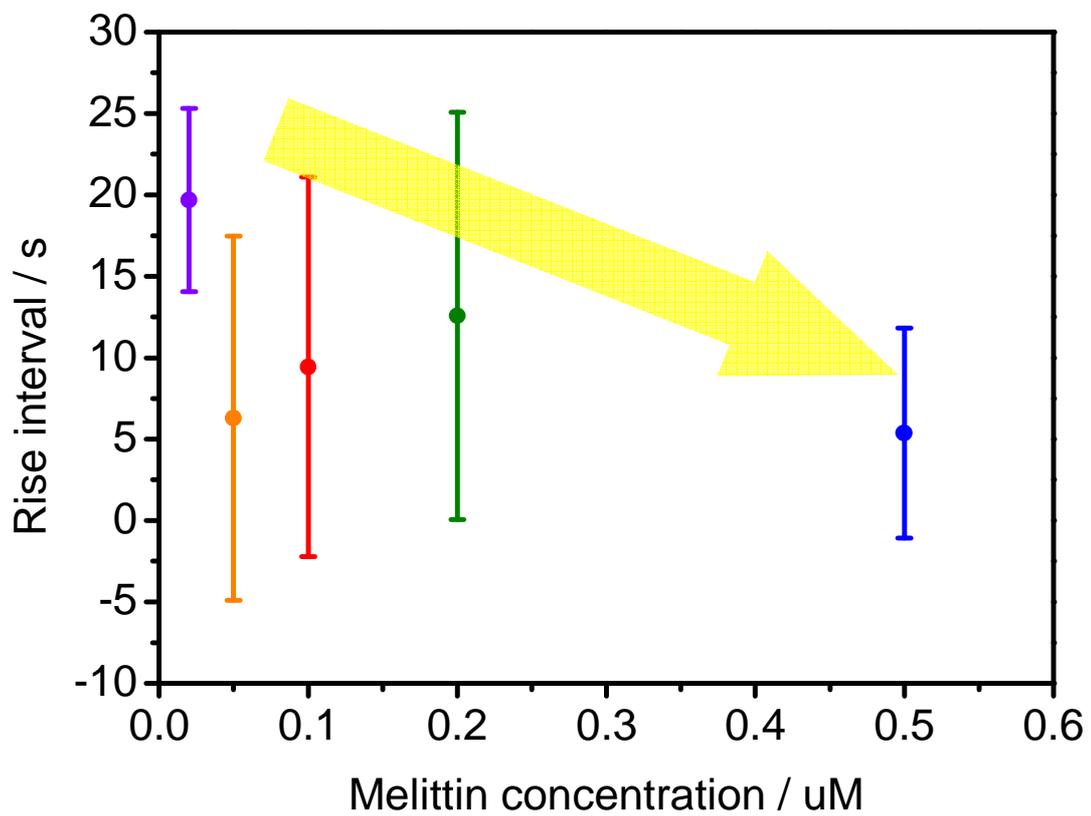


圖 3-9 不同蜂毒胜肽濃度的突峰峰值間距之高斯多峰分布擬合結果。

當蜂毒胜肽濃度上升，峰值間距有下降的趨勢。當溶液中的蜂毒胜肽越來越多，脂質體被碰撞的機會也越多，進而會增加蜂毒胜肽吸附在脂質體上的頻率，我們就會觀測到峰值間距越來越短的現象。

[Melittin] / $\mu\text{M}$	Rise height / V	FWHM / V	n
0.02	0.017	0.008	65
	0.037	0.011	
0.05	0.018	0.009	198
0.1	0.036	0.022	196
0.2	0.035	0.023	179
0.5	0.026	0.013	192
	0.046	0.010	
	0.066	0.004	

表 3-1 不同蜂毒胜肽濃度的上升高度多峰擬合結果

[Melittin] / $\mu\text{M}$	Rise time / s	FWHM / s	n
0.02	1.044	0.873	65
0.05	0.914	0.616	198
0.1	0.926	0.581	196
0.2	0.843	0.359	179
0.5	0.805	0.508	192

表 3-2 不同蜂毒胜肽濃度的上升時間多峰擬合結果

[Melittin] / $\mu\text{M}$	Rise interval / s	FWHM / s	n
0.02	19.688	5.633	53
0.05	6.286	11.174	188
0.1	9.439	11.656	189
0.2	12.574	12.499	168
0.5	5.369	6.457	174

表 3-3 不同蜂毒胜肽濃度的峰值間距多峰擬合結果

### 3-3 利用共聚焦顯微鏡觀察脂質體與蜂毒胜肽作用後的螢光影像變化

共聚焦顯微鏡自 1971 年問世之後<sup>36</sup>，經過不斷的改良，現在已經廣泛應用在許多領域，特別是生物影像的觀察。

在一片配製好的樣品中會有許多不同大小的脂質體，為了模擬真實細胞受到胜肽攻擊的環境（細胞膜表面積），我們傾向選用粒徑在 20-30  $\mu\text{m}$  的脂質體作測量，並紀錄二維-時間系列掃描 (XYT series scan) 的影像。

圖 3-10 (A) 是在不含蜂毒胜肽環境下取得的脂質體（粒徑為 16  $\mu\text{m}$ ）二維螢光影像，脂質體內部無明顯螢光，形貌完整；圖 3-10 (B) 為相對應的穿透光亮視野影像，沒有發現明顯失焦的現象。我們將隨時間紀錄的每張影像中脂質體內螢光訊號加總後，再除上脂質體的面積，得到脂質體的單位面積螢光強度隨時間變化圖，如圖 3-10 (C)。結果顯示，脂質體內部的平均強度很低且相當穩定，也表示未加入蜂毒胜肽時，細胞膜通透性很低，沒有螢光洩漏進去的情形發生。

當加入 2  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽後，出現了幾種不同結果：原本單一巨大單層脂質體（粒徑為 20  $\mu\text{m}$ ）內部無螢光，經過一段時間後螢光強度忽然增加，接著慢慢下降，如圖 3-11 (A)。若螢光是從膜上一個缺陷而引起螢光洩露，在空間中應會從缺陷處向內形成一道高濃度的染料流，所以從我們擷取的二維影像上，應有機會在脂質體內部看到螢光較強的區塊。針對螢光增強過程的影像結果來看，並沒有觀察到明顯的螢光亮區，如圖 (A) 中的 240 s-300 s 的影像，所以無法判斷染料是經由何種管道與方向進入膜內。螢光下降的現象有可能是膜上的缺陷消失後，稍早進入的染料流在脂質體內慢慢擴散造成。從圖 3-11 (C) 的單位面積螢光強度隨時間變化圖中，可以發現螢光有間歇性的上升情形，與單點螢光測量的實驗有相同的結果。比較 230 s 之前與 350 s 之後的平均螢光強度，後來螢光有略為升高的情形，且隨著時間增加，螢光有慢慢上升的趨勢。所以，在觀測過

程中，細胞膜的通透性出現突發性大幅度的提升，接著通透性急速減緩，最後我們由螢光緩慢而穩定上升的現象推測通透性達到一定值。從圖 3-11 (B) 的亮視野影像可以發現脂質體在觀測過程中沒有明顯漂移或形貌的改變。

另一種結果顯示加入 2  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽之後，脂質體 (粒徑為 20  $\mu\text{m}$ ) 的形貌與位置無變化 (圖 3-12 (B))，但脂質體內的螢光強度先下降再升高，直到內外螢光分子強度相仿，如圖 3-12 (A)，可見得細胞膜上通透性改變了，讓外部的染料可以持續進入內部。從螢光上升過程的影像中，如前一個例子觀察到的，沒有明顯的螢光亮區出現，也就是說，螢光呈現整體平均增強的現象，有可能對應到細胞膜整體的通透性改變，而非區域性的通透性改變。單位面積螢光強度隨時間變化圖顯示螢光在前 30 秒快速下降之後便持續上升 (圖 3-12 (C))，且初期上升速度較緩，接著上升速度增加，最後 150 秒內螢光增加速度有減緩的趨勢。我們也檢查螢光強度在上升過程的細部變化，並沒有發現如圖 3-11 的間歇性螢光上升情形。

所以，根據以上實驗，我們可以由蜂毒胜肽攻擊細胞膜之後的螢光變化，對應到通透性的變化。我們提出了三種蜂毒胜肽與細胞膜作用的模式。若以攻擊細胞膜的蜂毒胜肽數量來分類，可分為單一胜肽攻擊 (single melittin) 與多重蜂毒胜肽攻擊 (multiple melittins) 兩大類。

單一胜肽攻擊類別下，胜肽分子有可能進行如圖 3-13 (A) 的攻擊流程。在溶液中的蜂毒胜肽因靜電力作用吸附到細胞膜上，蜂毒胜肽會將膜上的脂質分子頭端向兩旁推開，造成細胞膜變薄的情形，並因為脂質分子暫時排列失序造成所謂膜的「缺陷」，外部螢光分子趁此時穿過細胞膜上的缺陷，我們會看到螢光上升的訊號。再者，當單一胜肽分子進行穿孔的翻轉動作時，也會推擠週遭的脂質分子，造成另一個膜缺陷來源。當胜肽分子脫離細胞膜時，缺陷便消失，螢光不再洩入脂質體內，稍早進入的螢光分子在內部擴散直到染料濃度達平衡，這種攻擊模式下，我們預期會看到如圖 3-13 (B) 的螢光變化圖，螢光會有間歇性的強度變化，在二維的螢光影像上，如前面敘述過的，在空間中應會從缺陷處向內形

成一道高濃度的染料流，所以在脂質體內部會看到螢光較強的區塊，我們也會觀察到螢光不均勻的現象。

單一蜂毒胜肽也有可能進行如圖 3-14 (A) 的攻擊流程。溶液中的蜂毒胜肽因靜電力吸附到細胞膜上後，擾亂整個細胞膜上脂質分子的排列，整體結構鬆散，進而導致整體性的細胞膜通透性增加，外部的螢光分子此時會進入脂質體內部，我們預期會看到如圖 3-14 (B) 的螢光變化圖，螢光會持續上升直到蜂毒胜肽分子脫離細胞膜，脂質分子的排列恢復為止。二維的螢光影像上應會看到均勻的螢光增強情形。

我們也假設脂質體會受到多重蜂毒胜肽的攻擊，流程如圖 3-15 (A)。多個蜂毒胜肽因靜電吸附到細胞膜上，並在細胞膜上流動，接著多個蜂毒胜肽在膜上形成孔洞，此時螢光分子會洩入脂質體，若孔洞的結構不穩定，胜肽分子有可能會再散開，產生類似孔洞關閉 (pore closing) 的細胞膜癒合現象，螢光便不再上升，稍早進入的螢光分子會在內部擴散直到染料濃度達到平衡，且我們預期會看到如圖 3-13 (B) 的螢光變化圖，但上升幅度會比單一蜂毒胜肽攻擊的還大。若孔洞的結構穩定，預期觀察到螢光持續上升。但形成孔洞需要在較高濃度的蜂毒胜肽溶液中才會發生，而我們使用的蜂毒胜肽濃度很低，所以針對我們的實驗結果，此種模式的可能性較小。

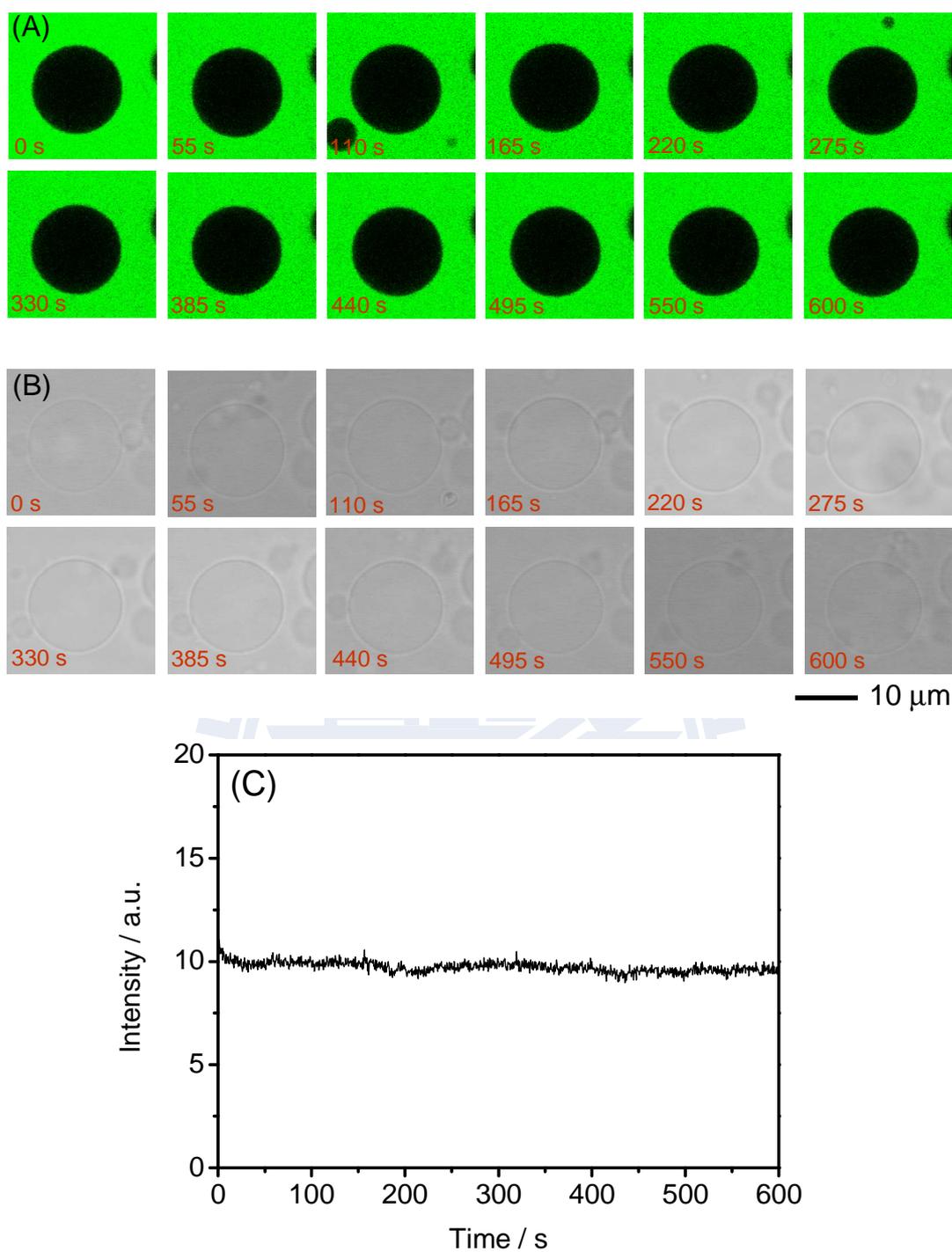


圖 3-10 未加蜂毒肽的脂質體之共聚焦顯微鏡影像與分析。

(A) 二維螢光影像變化，(B) 穿透光亮視野影像，(C) 脂質體內部單位面積的螢光強度隨時間變化圖。脂質體粒徑為 16 μm。

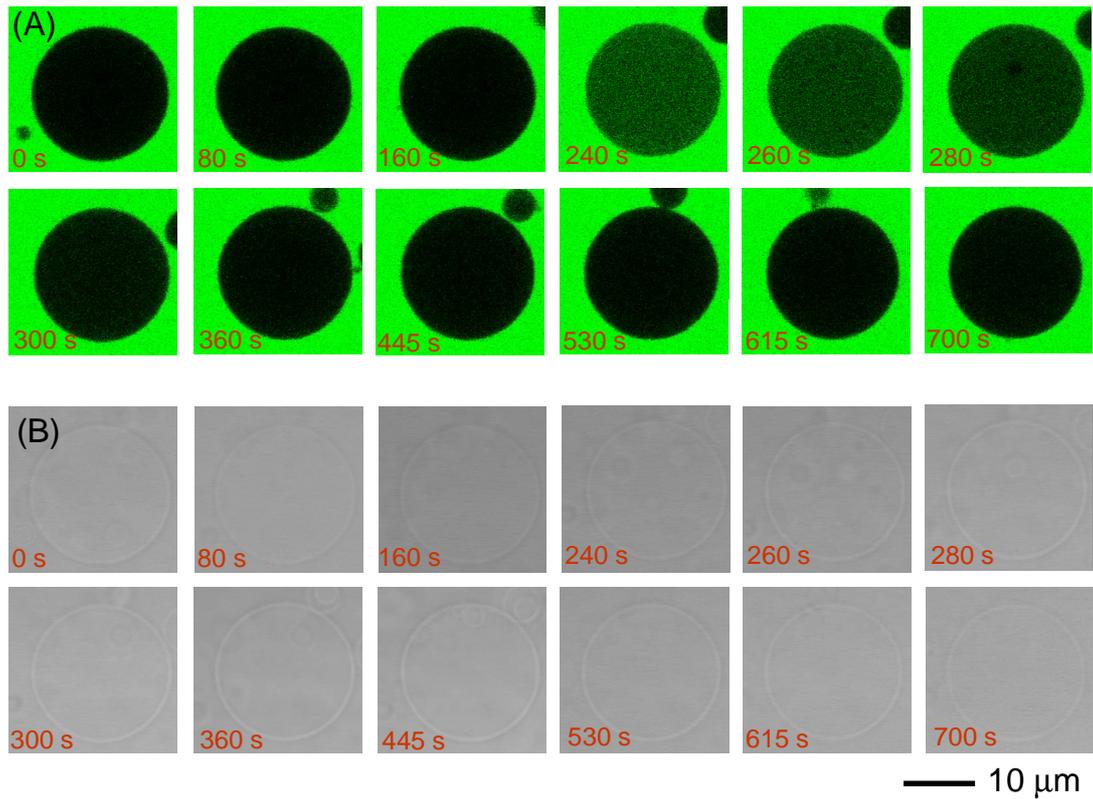


圖 3-11 加入 2  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽的脂質體之共聚焦顯微鏡影像與分析。

此例中有突峰 (spike) 發生。(A) 二維螢光影像變化，(B) 穿透光亮視野影像，(C) 脂質體內部單位面積的螢光強度隨時間變化圖。脂質體粒徑為 20  $\mu\text{m}$ 。

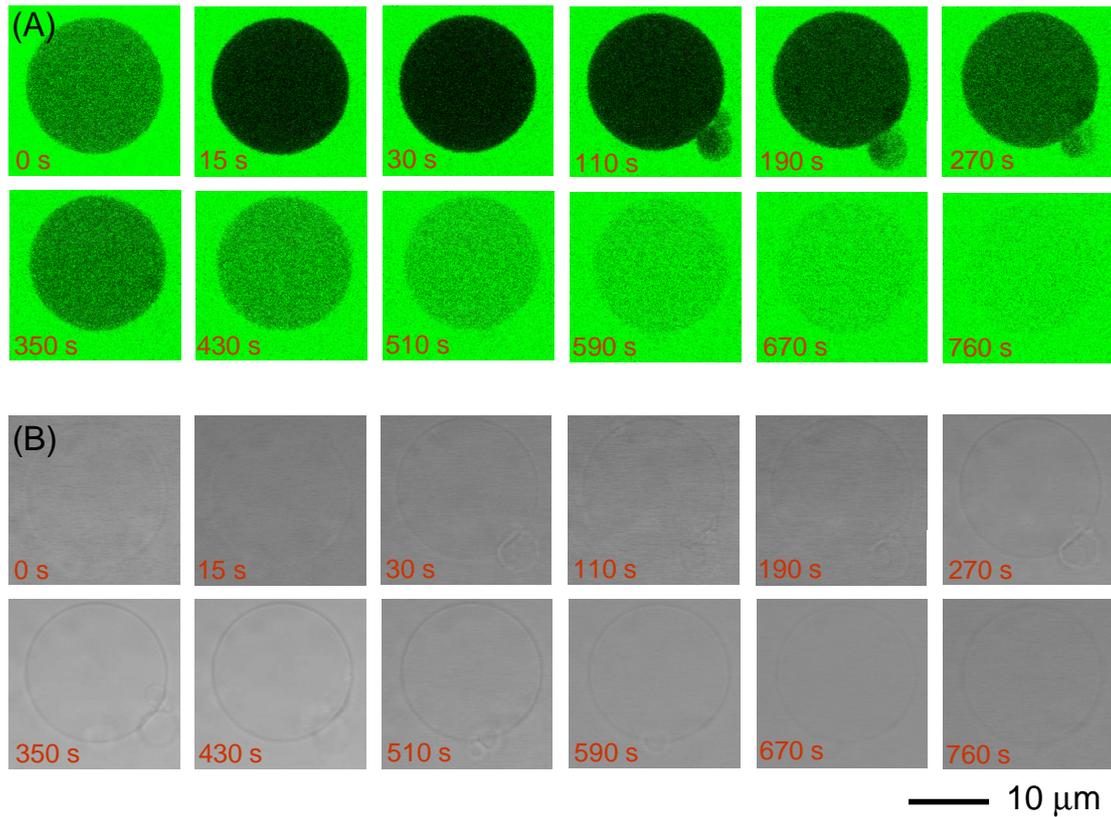


圖 3-12 加入 2 μM 蜂毒胜肽的脂質體之共聚焦顯微鏡影像與分析。

此例中脂質體內的螢光強度漸漸上升。(A) 二維螢光影像變化，(B) 穿透光亮視野影像，(C) 脂質體內部單位面積的螢光強度隨時間變化圖。脂質體粒徑為 20 μm。

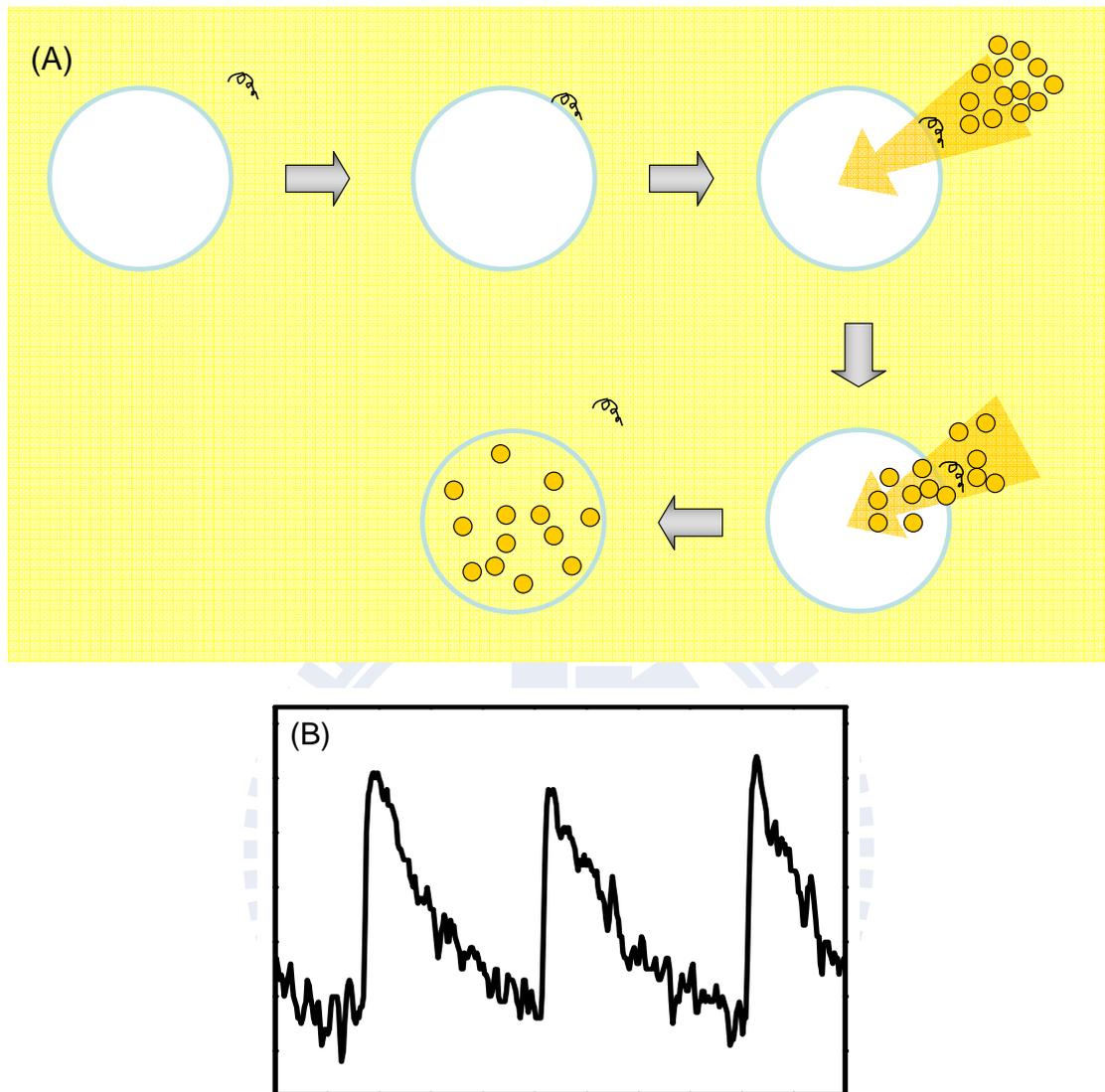


圖 3-13 單一蜂毒胜肽攻擊造成間歇性強度增加模型。

(A) 溶液中的蜂毒胜肽因靜電力作用吸附到細胞膜上，蜂毒胜肽會將膜上的脂質分子頭端向兩旁推開，造成細胞膜變薄的情形，並因為脂質分子暫時排列失序造成所謂膜的「缺陷」，外部螢光分子趁此時穿過細胞膜上的缺陷，我們會看到螢光上升的訊號。再者，當單一胜肽分子進行穿孔的翻轉動作時，也會推擠週遭的脂質分子，造成另一個膜缺陷來源。當胜肽分子脫離細胞膜時，缺陷便消失，螢光不再洩入脂質體內，稍早進入的螢光分子在內部擴散直到染料濃度達平衡。(B) 會有間歇性的強度變化。

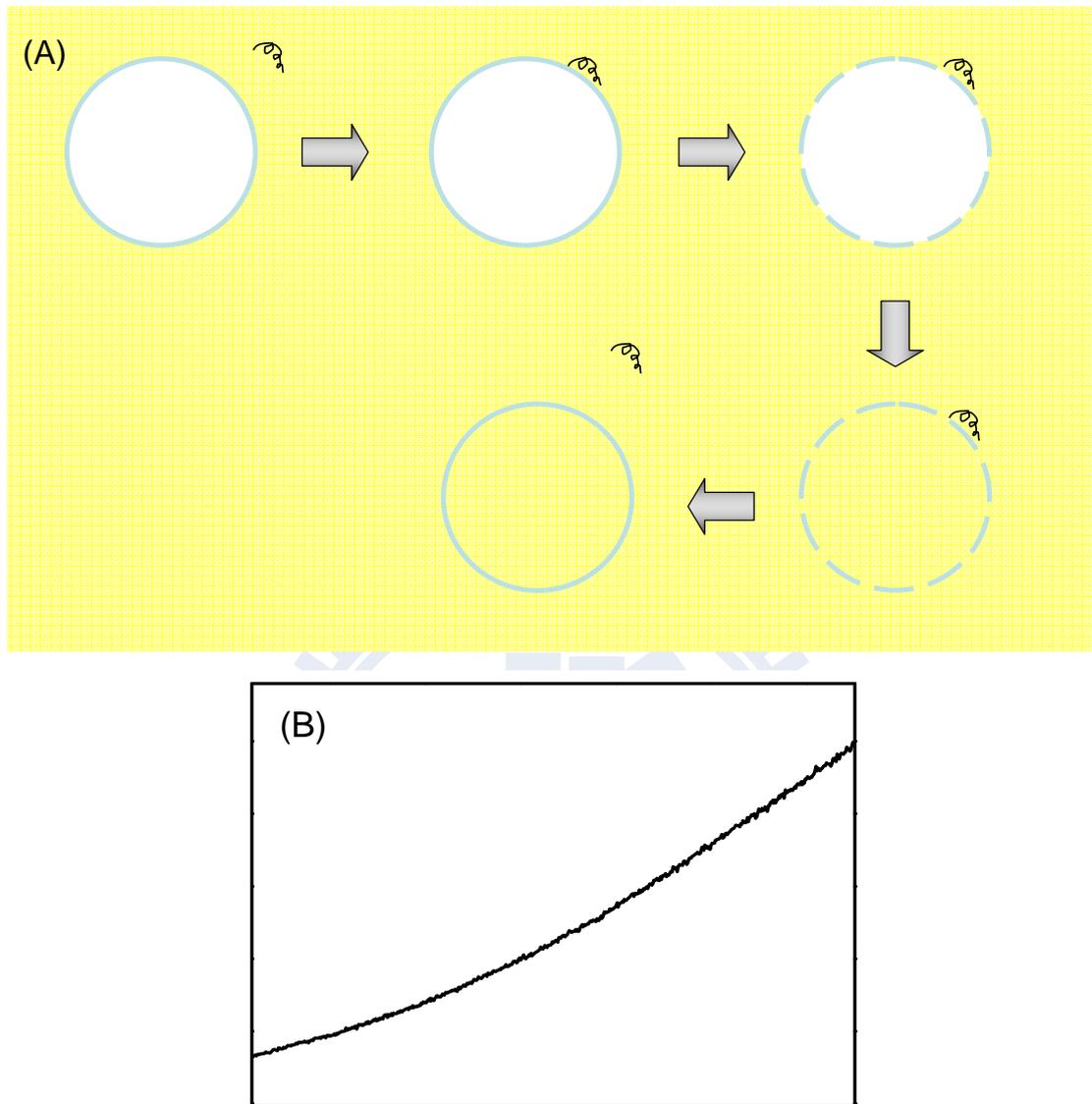


圖 3-14 單一蜂毒胜肽攻擊造成持續性強度增加模型。

(A) 溶液中的蜂毒胜肽因靜電力吸附到細胞膜上後，擾亂整個細胞膜上脂質分子的排列，整體結構鬆散，進而導致整體性的細胞膜通透性增加，外部的螢光分子此時會進入脂質體內部，直到蜂毒胜肽分子脫離細胞膜，脂質分子的排列恢復為止。(B) 螢光會持續上升。

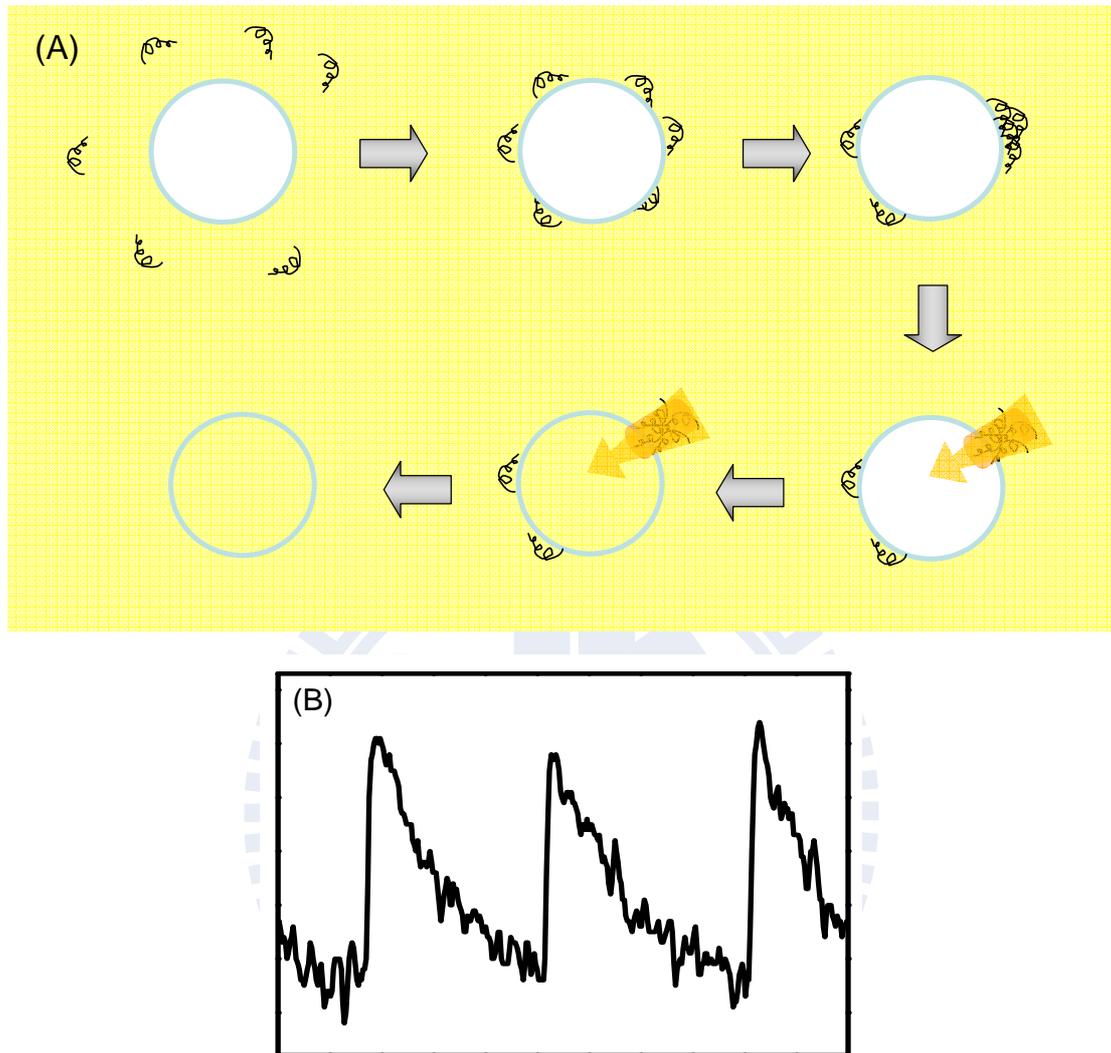


圖 3-15 多重蜂毒胜肽攻擊造成間歇性強度增加模型。

(A) 多個蜂毒胜肽因靜電吸附到細胞膜上，並在細胞膜上流動，接著多個蜂毒胜肽在膜上形成孔洞，此時螢光分子會洩入脂質體，若孔洞的結構不穩定，胜肽分子有可能會再散開，產生類似孔洞關閉 (pore closing) 的細胞膜癒合現象，螢光便不再上升，稍早進入的螢光分子會在內部擴散直到染料濃度達到平衡。(B) 會有間歇性的強度變化，但上升幅度會比單一蜂毒胜肽攻擊的還大。

### 3-4 脂質體與蜂毒胜肽作用後膜流動性的變化

細胞膜肩負許多重要的生理功能，而細胞膜的流動性會影響這些功能的運作，當流動性改變，可能會造成這功能的減弱或消失，進而引起細胞死亡。我們利用螢光相關光譜技術偵測細胞膜的流動性變化，來得知蜂毒胜肽對細胞膜上生理功能的影響。

我們將脂質體與不同濃度的蜂毒胜肽混合，待其反應 10 分鐘後，量取膜上染料分子的擴散時間。將擴散時間代入  $D = \frac{r_0^2}{4\tau_{diff}}$  式中算出擴散係數  $D$ 。圖 3-16

為未加入與加入 10  $\mu\text{M}$  與 60  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽後染料分子 DiD 在 POPC 脂質膜上的自相關曲線，曲線皆經過均一化處理。未加入蜂毒胜肽時，平均擴散係數為  $5.53 \pm 0.48 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ，加入 10  $\mu\text{M}$  與 60  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽後的平均擴散係數分別為  $3.45 \pm 0.36 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  與  $3.04 \pm 0.28 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ，相較於未加入蜂毒胜肽的平均擴散係數，後兩者有顯著的下降。也就是說，加入蜂毒胜肽會降低細胞膜的流動性。我們推測流動性變慢，有可能是當帶正電的蜂毒胜肽吸附在膜上，與脂質分子頭端的電荷吸引作用，導致細胞膜上有脂質排列較緊密的區塊，因此膜上的脂質分子要進行自由擴散運動時，變的較不容易。

圖 3-17 與表 3-4 為加入不同濃度蜂毒胜肽的統計圖結果。可以發現在加入蜂毒胜肽之後，擴散係數皆有顯著的下降，且蜂毒胜肽濃度高於 30  $\mu\text{M}$  的擴散係數有趨於一個定值的傾向。這個傾向意味著，蜂毒胜肽對於細胞膜流動性的影響有一定的程度，並非與濃度成正比，這可能代表蜂毒胜肽在細胞膜上的分布已達飽和，即使增加更多的蜂毒胜肽，也無法再繼續影響細胞膜流動性。

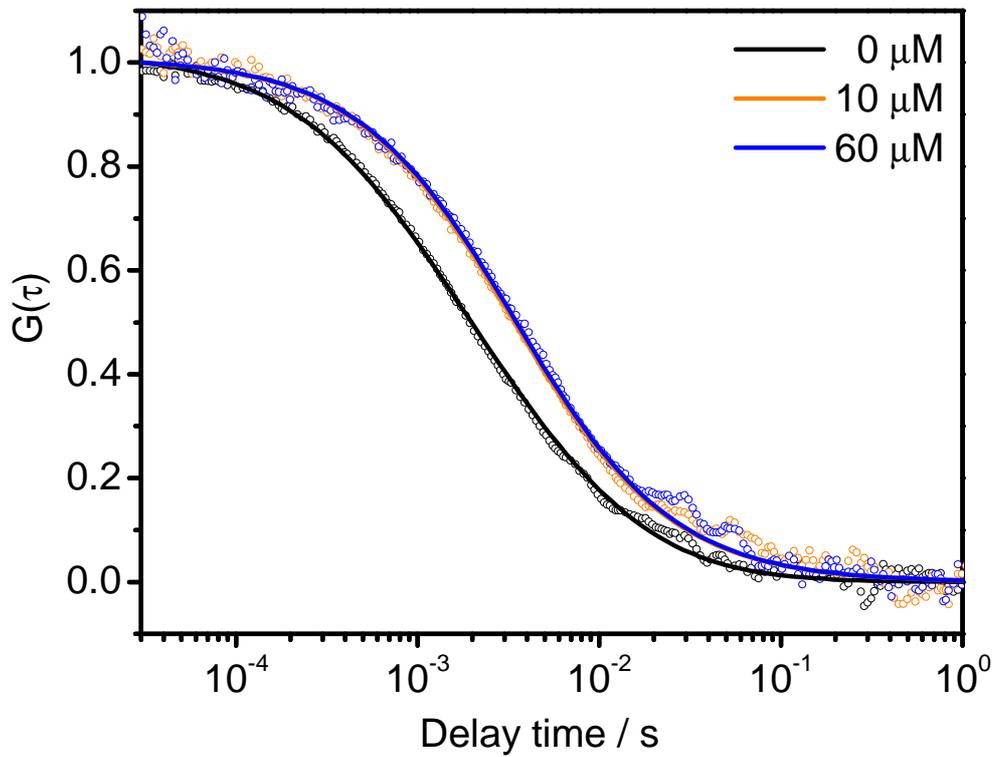


圖 3-16 混合不同蜂毒胜肽濃度後的染料分子 DiD 在 POPC 膜上運動得到的自相關曲線圖。

黑色曲線表示未加入蜂毒胜肽的自相關曲線，橘色與藍色分別為加入 10  $\mu\text{M}$  與 60  $\mu\text{M}$  蜂毒胜肽後的自相關曲線。加入蜂毒胜肽後，可以發現染料分子的擴散時間增加，流動性有顯著下降。

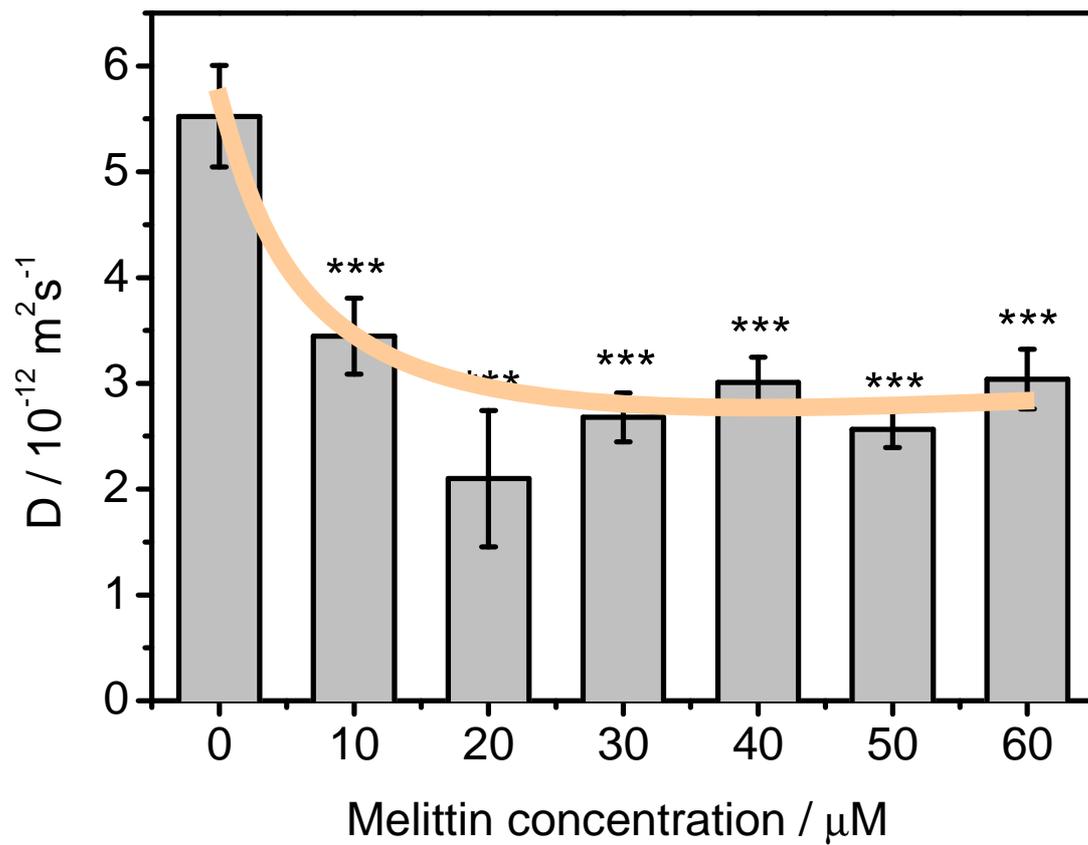


圖 3-17 不同蜂毒胜肽濃度的流動性統計結果。

加入蜂毒胜肽後，擴散常數有顯著的下降。且當濃度超過 30  $\mu\text{M}$ ，流動性趨於一個定值。

[Melittin] / $\mu\text{M}$	Diffusion coefficient / $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	Number of sample	<i>P value</i>
0	5.53±0.49	6	
10	3.45 ±0.36	7	1.08×10 <sup>-5</sup>
20	2.10±0.64	6	2.45×10 <sup>-6</sup>
30	2.68±0.23	8	2.94×10 <sup>-6</sup>
40	3.01±0.24	6	8.21×10 <sup>-6</sup>
50	2.57±0.17	7	7.14×10 <sup>-6</sup>
60	3.04±0.28	8	3.27×10 <sup>-6</sup>

\*\*\*: significantly different from the control,  $P < 0.001$

表 3-4 不同峰毒胜肽濃度的流動性統計結果。



## 第四章、結論與未來展望

在本論文中，為了了解吸附在細胞膜上的蜂毒胜肽形成孔洞的機制，除了已商業化的共聚焦螢光影像偵測方式與漸趨成熟的螢光相關光譜技術，我們更建立一套系統與測量方法提供即時觀測單一脂質體受到蜂毒胜肽攻擊後的單點螢光變化，且設計簡單，無樣品製備繁複的困擾。

我們利用自行架設的共聚焦螢光顯微系統，測量不同濃度下的脂質體內部螢光變化情形，並將結果中的突峰進行參數與統計分析，我們推測蜂毒胜肽有單分子的攻擊行為。從共聚焦顯微鏡得到幾種不同的螢光變化結果：螢光忽然增強又漸漸變弱、螢光慢慢增加直到內外相同。我們可以知道：細胞膜與蜂毒胜肽接觸後會增加細胞膜的通透性。另外，我們也提出三種蜂毒胜肽攻擊行為的假設。

我們也利用螢光相關光譜技術量測細胞膜的流動性變化，發現與蜂毒胜肽接觸後，細胞膜的流動性有顯著的變慢現象，且此影響有一定的限度，並非與濃度成正比，這可能代表蜂毒胜肽在細胞膜上的分布密度已達飽和，增加蜂毒胜肽，也無法再繼續影響細胞膜流動性。

針對本論文的實驗設計，我們可以做一些修改來增進測量的穩定度與提高訊雜比。混合樣品時，我們可以在玻片表面與脂質體上修飾官能基，將脂質體固定位置，降低漂動造成的螢光擾動。我們也可以對脂質體進行粒徑的篩選，鎖定觀測單一粒徑的脂質體有助於做定量的分析。

在本論文中，我們使用多種螢光技術觀察單一脂質體與蜂毒胜肽作用的即時螢光影像、強度變化、與膜流動性變化，未來我們也可以利用這些技術觀察不同細胞膜成分的脂質體或是不同胜肽的攻擊行為作為本實驗的延伸。

# 附錄

## 附錄一 實驗相關藥品

附錄表一 實驗藥品

藥品	說明	製造商
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine 16:0/18:1(9Z) PC	Avanti, U.S.A.
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform	J.T. Baker, U.S.A.
DiD	Lipophilic dye, Sub-cellular localization: cell membranes and lipids, Abs/Emi: 648 nm/670 nm	Molecular Probes, U.S.A.
MeOH	Methanol	J.T. Baker, U.S.A.
Glucose	D-(+)-glucose, ≥99.5% (GC)	Sigma, U.S.A.
NaCl	Sodium chloride ≥99.5% (titration)	Sigma, U.S.A.
CF	5(6)-carboxyfluorescein, Abs/Emi: 492 nm/517 nm	Fluka, U.S.A.
R6G	Rhodmine 6G chloride Abs/Emi:428 nm/551 nm	Molecular Probes, U.S.A.
Alexa633	Abs/Emi: 632 nm/647 nm	Molecular Probes, U.S.A.
Melittin	The main component of the honeybee venom, M <sub>r</sub> : 2846.50, Purity: > 97% by reverse phase HPLC	Bachem, Switzerland

## 參考資料

1. Mauch, F.; Mauch-Mani, B.; Boller, T., Antifungal hydrolases in pea tissue: II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase. *Plant Physiology* **1988**, *88*, 936-942.
2. Schlumbaum, A.; Mauch, F.; Vogeli, U.; Boller, T., Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **1986**, *324*, 365-367.
3. Silphaduang, U.; Noga, E., Antimicrobials: peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* **2001**, *414*, 268-269.
4. Campagna, S.; Saint, N.; Molle, G.; Aumelas, A., Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1771-1778.
5. Park, I.; Park, C.; Kim, M.; Kim, S., Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters* **1998**, *437*, 258-262.
6. Steiner, H.; Hultmark, D.; Engstrom, A.; Bennich, H.; Boman, H., Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *The Journal of Immunology* **1981**, *292*, 246-248.
7. Brogden, K. A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3*, 238-250.
8. Brogden, K.; De Lucca, A.; Bland, J.; Elliott, S., Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 412-416.
9. Brotz, H.; Bierbaum, G.; Leopold, K.; Reynolds, P.; Sahl, H., The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy* **1998**, *42*, 154-160.
10. Subbalakshmi, C.; Sitaram, N., Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiology Letters* **1998**, *160*, 91-96.
  11. Boman, H.; Agerberth, B.; Boman, A., Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity* **1993**, *61*, 2978-2984.
  12. Otvos Jr, L.; Insug, O.; Rogers, M.; Consolvo, P.; Condie, B.; Lovas, S.; Bulet, P.; Blaszczyk-Thurin, M., Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14150-14159.
  13. Yeaman, M. R.; Yount, N. Y., Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **2003**, *55*, 27-55.
  14. Habermann, E.; Jentsch, J., Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie* **1967**, *348*, 37-50.
  15. Habermann, E., Bee and wasp venoms. *Science* **1972**, *177*, 314-322.
  16. Dempsey, C. E., The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1990**, *1031*, 143-161.
  17. Raghuraman, H.; Chattopadhyay, A., Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience Reports* **2007**, *27*, 189-223.
  18. Brown, L. R.; Lauterwein, J.; Wuthrich, K., High-resolution H-1-NMR studies of self-aggregation of melittin in aqueous -solution. *Biochimica et Biophysica Acta* **1980**, *622*, 231-244.
  19. Hoskin, D. W.; Ramamoorthy, A., Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2008**, *1778*, 357-375.
  20. Terwilliger, T. C.; Eisenberg, D., The structure of melittin .2. interpretation of

- the structure *Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 6016-6022.
21. Jentsch, J., Further studies on the amino acid sequence of melittin. IV. Measurement of optical rotatory dispersion. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil B: Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **1969**, 24, 33-35.
  22. Kreil, G.; Bachmayer, H., Biosynthesis of melittin, a toxic peptide from bee venom. Detection of a possible precursor. *European journal of biochemistry/FEBS* **1971**, 20, 344-350.
  23. Lin, J. H.; Baumgartner, A., Adsorption of melittin to a lipid bilayer : a molecular dynamics study. *Journal of Molecular Liquids* **2000**, 84, 89-98.
  24. Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W., Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal* **2001**, 81, 1475-1485.
  25. Papo, N.; Shai, Y., Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry* **2003**, 42, 458-466.
  26. Lee, M. T.; Chen, F. Y.; Huang, H. W., Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry* **2004**, 43, 3590-3599.
  27. Kwok, R.; Evans, E., Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophysical Journal* **1981**, 35, 637-652.
  28. van den Bogaart, G.; Guzman, J. V.; Mika, J. T.; Poolman, B., On the mechanism of pore formation by melittin. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 33854-33857.
  29. van den Bogaart, G.; Mika, J. T.; Krasnikov, V.; Poolman, B., The lipid dependence of melittin action investigated by dual-color fluorescence burst analysis. *Biophysical Journal* **2007**, 93, 154-163.
  30. Yu, L.; Ding, J. L.; Ho, B.; Feng, S.-S.; Wohland, T., Investigation of the

- mechanisms of antimicrobial peptides interacting with membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *The Open Chemical Physics Journal* **2008**, *1*, 62-79.
31. Mally, M.; Majhenc, J.; Svetina, S.; Zeks, B., The response of giant phospholipid vesicles to pore-forming peptide melittin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2007**, *1768*, 1179-1189.
  32. Kim, S. A.; Heinze, K. G.; Schwille, P., Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nature Methods* **2007**, *4*, 963-973.
  33. van den Bogaart, G.; Krasnikov, V.; Poolman, B., Dual-color fluorescence-burst analysis to probe protein efflux through the mechanosensitive channel MscL. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 1233-1240.
  34. Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S., Liposome electroformation. *Faraday Discussions* **1986**, *81*, 303-311.
  35. Benda, A.; Benes, M.; Marecek, V.; Lhotsky, A.; Hermens, W. T.; Hof, M., How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir* **2003**, *19*, 4120-4126.
  36. Davidovits, P.; Egger, M., Scanning laser microscope for biological investigations. *Applied Optics* **1971**, *10*, 1615-1619.